EINFLUSS DER MG-VERARMUNG AUF DEN NUCLEINSÄURESTOFFWECHSEL VON ANACYSTIS NIDULANS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Ursula Seitz, geb. Köstlin

aus Stuttgart

1969

EINFLUSS DER MG-VERARMUNG AUF DEN NUCLEINSÄURESTOFFWECHSEL VON ANACYSTIS NIDULANS

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ursula Seitz geb. Köstlin
aus Stuttgart

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.April 1969

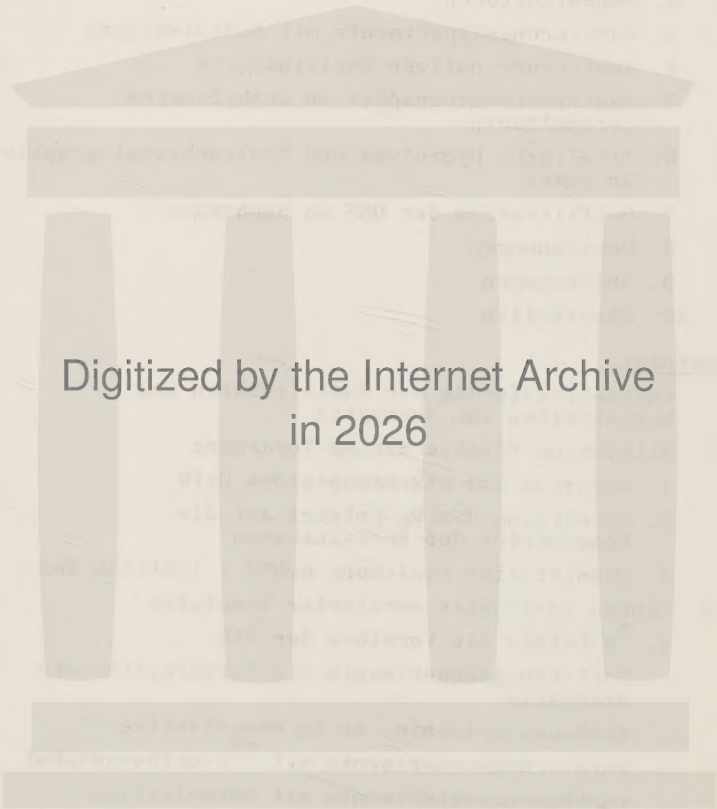
Dekan: Prof.Dr.A.Seilacher

1.Berichterstatter: Prof.Dr.G.Richter

2.Berichterstatter: Prof.Dr.E.Bünning

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	4
1. Versuchsorganismus und Kultur	4
2. Mangelkulturen	4
3. Markierungsexperimente mit Radioisotopen	5
4. Isolierung nativer Nucleinsäuren	6
5. Säulenchromatographie an methyliertem Serumalbumin	6
6. Alkalische Hydrolyse und Säulenchromatographie an Dowex	7
7. Gelfiltration der DNS an Sepharose	8
8. Berechnungen	8
9. Abkürzungen	9
10. Chemikalien	9
Ergebnisse	10
I. Charakterisierung der Nucleinsäuren aus Normalzellen von Anacystis	10
II. Allgemeine Effekte der Mg-Verarmung	12
1. Wachstum und mikroskopisches Bild	12
2. Auswirkung des Mg-Entzugs auf die Komponenten der Nucleinsäuren	13
3. Quantitative Beziehung hmRNS : lösliche RNS	17
III. Einbau radioaktiv markierter Vorstufen	17
1. ^{3}H-Uridin als Vorstufe der RNS	18
Markierungsexperimente mit Normalzellen von Anacystis	18
Einbauexperimente an Mg-Mangelzellen	26
2. Markierungsexperimente mit ^{32}P-Orthophosphat	31
Markierungsexperimente mit Normalzellen	31
^{32}P-Markierungsexperimente an Mg-verarmten Zellen	38
3. "Chase"-Experimente	43
Diskussion	45
Zusammenfassung	52
Literaturverzeichnis	54



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0119

EINLEITUNG

Die Beziehungen zwischen Mg-Ionen und Nucleinsäuren sind bisher bei Bakterien bzw. daraus gewonnenen Systemen näher untersucht worden. So ist bei allen Nucleinsäure- und Ribosomenpräparationen ein gewisser Zusatz an Mg^{2+} notwendig, um die Stabilität der Strukturen zu sichern. Dabei kann Mg^{2+} sowohl von Ribonucleinsäure als auch von Desoxyribonucleinsäure gebunden werden (SHACK u.BYNUM 1959; STAEHELIN 1959; SHEARD u. Mitarb. 1967).

Die Struktur der Ribosomen und Polysomen bleibt im isolierten Zustand nur in Gegenwart einer ausreichenden Menge an Mg-Ionen erhalten (CIERER 1963). Sinkt die Mg-Konzentration unter einen Grenzwert ab, so zerfallen die Ribosomen in Untereinheiten definierter Größenordnungen (TS'O u. Mitarb. 1958; TISSIERES u. Mitarb. 1959; ZUBAY 1959; STORCK 1963). HSIAO (1964) berichtet, daß die Dissoziation der entstandenen 80S Partikeln bei pH-Anstieg durch Mg-Zugabe unterbunden werden kann. Ebenso können Ribosomenuntereinheiten, die durch H_2O_2-Einwirkung entstanden sind, bei Zusatz von Mg^{2+} wieder zur Zusammenlagerung gebracht werden (NAKAMURA und Mitarb. 1968). Dabei hat sich gezeigt, daß Ribosomen das Magnesium über ihren RNS-Anteil binden (HAMILTON u. PETERMANN 1959; GOLDBERG 1966; EDELMAN u. Mitarb. 1960; CHCI und CARR 1967) und zwar über die Phosphorsäure der RNS (BANERJEE u. PERKINS 1962).

Die Stabilisierung isolierter Nucleinsäuren durch Mg^{2+} ist auch bei einigen Reaktionen derselben zu beobachten. Die Denaturierung der DNS durch Säure kann durch Zusatz von Mg^{2+} verhindert werden. Andere Kationen zeigen nur bedingt diesen Effekt (BARBER 1967; ERLENMEYER u. Mitarb. 1968). Als ein Beispiel für eine Stabilisierung von RNS durch Mg-Ionen im Sinne der Bewahrung von biologischer Aktivität sei die Erhaltung der Infektiosität isolierter TMV-RNS erwähnt

(CHEO u. Mitarb. 1959).

Zur Stabilisierung von RNS sind grundsätzlich Mg-Ionen erforderlich; Unterschiede bestehen lediglich in quantitativer Hinsicht. So sind Ribosomen aus Reticulocyten weit weniger empfindlich gegenüber Mg^{2+}-Entzug als die aus Bakterien (NOLAN u. Mitarb. 1968).

Die Bedeutung von Mg^{2+} für die lebende Zellen, besonders für den Stoffwechsel der Nucleinsäuren ist bisher nur für die Bakterienzelle näher untersucht worden. Bei Anzucht in einem Mg-freien Nährmedium werden in den Zellen von Escherichia coli bereits nach kurzer Zeit die Ribosomen abgebaut; die schwereren Partikeln werden dabei zuerst betroffen (ARONSON u. McCARTHY 1961; McCARTHY 1962; SUZUKI u. HAYASHI 1964); analoge Befunde für Aerobacter aerogens berichteten KENNELL u. MAGASANIK (1962). Nach Schätzungen von McCARTHY soll der Gehalt an Ribosomen im extremen Mg-Mangel nur noch etwa 5% der Normalmenge betragen. In diesem Zustand ist auch die Synthese von Protein und DNS sehr gering. Die Menge an RNS ist im Zustand des Mg-Mangels reduziert, bedingt vor allem durch den Abbau ribosomaler RNS (SUZUKI u. HAYASHI 1964; NAKADA u. MARQUISEE 1965; NATORI u. Mitarb. 1965; NAONO u. Mitarb. 1966).

Die Untersuchungen zur Bedeutung des Magnesiums für die Pflanzenzelle konzentrieren sich im wesentlichen auf allgemeine Stoffwechselerscheinungen. Interessanter für unsere Fragestellung sind zwei Beobachtungen: BADOUR (1961) fand nach Mg-Entzug bei Grünalgen eine Sistierung der Zellteilungen und eine Zunahme der Zellgröße. GALLING (1963) beschreibt, daß unter diesen Bedingungen bei Chlorella eine Nettosynthese von RNS fehlt. Besonders in Hinsicht auf den letztgenannten Effekt schien es wünschenswert, zunächst die Auswirkungen der Mg-Verarmung auf Verteilung und Synthese der Nucleinsäuren in einzelligen Algen genauer zu analysieren.

Dabei wurde die Garnitur der Nucleinsäuren von Normal- und Mangelzellen auf Grund ihrer Markierbarkeit mit radioaktiven Vorstufen, ihres Eluierungsmusters bei MAK-Chromatographie und ihrer Basenzusammensetzung charakterisiert. Die Zuordnung der verschiedenen Komponenten zu den Zellfraktionen erfolgte mit Hilfe einer fraktionierenden Zentrifugationstechnik.

Für fast alle Versuche wurde die blaugrüne Alge Anacystis nidulans herangezogen, da auf Grund ihrer einfachen Organisation ein Vergleich mit den Befunden an Bakterien am ehesten möglich ist. Einige ergänzende Versuche wurden an der Grünalge Chlorella pyrenoidosa und an den Zellen einer Gewebekultur von Petroselinum sativum durchgeführt, um zu zeigen, in wieweit die beobachteten Effekte allgemeiner Natur sind.

Mit diesem Problemkreis in Verbindung steht die Frage nach dem Vorkommen und der Funktion schnell markierter RNS vom "messenger"-Typ in den Zellen dieser Organismen. Bekanntlich erfolgt die Anheftung der "messenger"-RNS an Ribosomen nur in Gegenwart von Mg^{2+} (MOORE u. ASANO 1966). Da sich Mg-verarmte Zellen bei Überführung in Vollmedium schnell erholen und dabei ihre Proteine und Nucleinsäuren offensichtlich rasch bis zum Erreichen des normalen Gehalts vermehren, müßte in dieser Phase "messenger"-RNS gut nachweisbar sein.

MATERIAL und METHODEN

1. Versuchsorganismus und Kultur

Als Versuchsobjekt diente hauptsächlich die blaugrüne Alge Anacystis nidulans[1]. Die Anzucht erfolgte in dem von KRATZ & MYERS (1955) beschriebenen Medium, jedoch mit dem Unterschied, daß Eisen als EDTA-Fe-Komplex zugesetzt wurde. Die Algen wuchsen steril bei 34°C, im Dauerlicht (9000 Lux) in Kulturröhren aus Jenaerglas (Höhe 42 cm, Ø innen 3.6 cm), in die von unten ein Luft-CO_2-Gemisch mit 2-3% CO_2 eingeleitet wurde. Die Anzuchtröhren standen im temperaturkonstanten Wasserbad eines Lichtthermostaten der Firma F. Kniese, Marburg/L.

Für Vergleichsversuche wurde die Grünalge Chlorella pyrenoidosa (Algensammlung Göttingen, Stamm 211/8b) verwendet. Das Nährmedium wurde entsprechend den Angaben von KUHL (1962) zusammengestellt. Die Zellen wurden wie Anacystis im Lichtthermostaten, jedoch bei 30°C kultiviert.

Suspensionskulturen von Kallusgeweben höherer Pflanzen (Petroselinum sativum) wurden nach den Angaben von SEITZ & RICHTER hergestellt[2].

2. Mangelkulturen

Anacystis und Chlorella: Die Suspension einer Normalkultur, die zuvor (12-24 h) 1 : 2 verdünnt worden war, wurde steril zentrifugiert, die sedimentierten Zellen im Anzuchtmedium suspendiert, das nur 10% der normalen Mg-Menge enthielt. Nach 24 h wurden die Zellen steril in Mg-freie Nährlösung

---

[1] Neuerdings als Lauterbornia (Anacystis) nidulans bezeichnet (PRINGSHEIM 1968).

[2] Das Versuchsmaterial wurde von Herrn SEITZ freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

überführt. Die Mangelkulturen wurden in allen Fällen auf eine definierte Zelldichte eingestellt. Ihre Bestimmung erfolgte in Hämatokritröhrchen nach Hamburger. Sie wurden mit 1.0 ml der Zellsuspension beschickt und 15 min bei 3 100 U/min (Christ Laborzentrifuge) zentrifugiert. Die Zellen werden bei diesem Verfahren in den graduierten Kapillarenansatz gedrückt; ihr Volumen kann direkt abgelesen werden. Die erhaltenen Werte stimmten mit den Ergebnissen parallel durchgeführter Trockengewichtsbestimmungen sehr gut überein.

Petroselinum: Die Zellen wurden steril mittels Filtration durch "Vlieseline" der Normalkultur entnommen, mehrmals mit Mg-freiem Nährmedium gewaschen und schließlich darin suspendiert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte ebenfalls in Hämatokritröhrchen, deren Kapillare wegen der größeren Zellen modifiziert werden mußte (Anfertigung der Firma Bühler, Tübingen).

3. Markierungsexperimente mit Radioisotopen

^{32}P-Orthophosphat: Um eine ausreichende Fixierung bei möglichst kurzer Inkubation zu erreichen, war es unumgänglich, die Kultur vorher an Phosphat zu verarmen. Die Zellen wurden daher niedertourig in vorgewärmter Zentrifuge niedergeschlagen und in P-freier Nährlösung für 2 h normal begast und belichtet. 5 µC/ml ^{32}P-Orthophosphat wurden zugesetzt und die Suspension am Ende der Einbauzeit sofort auf zerstoßenes Eis gekippt. Die weitere Aufarbeitung (s.u.) der inkubierten Zellen erfolgte bei 0-4°C.

Bei einem langfristigen Einbauversuch erübrigte sich die Vorinkubation im P-freien Kulturmedium. Die Zellen wurden unter den oben erwähnten Vorsichtsmaßnahmen zentrifugiert, in ^{32}P-haltigem Nährmedium suspendiert und für 12 h in Gegenwart von 2.5 µC/ml im Licht kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

^{3}H-Uridin: Sowohl bei Kurzzeitmarkierungs- als auch bei Dauereinbauversuchen waren die Zellen in einem 1 : 10 verdünnten Nährmedium suspendiert. Kurzfristigen Inkubationen ging eine 2-stündige Erholung der Zellen in dieser Lösung voraus.

4. Isolierung nativer Nucleinsäuren

Die Extraktion der Nucleinsäuren erfolgte in Anlehnung an das von RICHTER & SENGER (1964) beschriebene Verfahren. Die gewaschenen Algen wurden in Tris-Puffer[1] (0.05 m Tris, 0.002 m $MgSO_4$) pH 7.5 suspendiert und mit Glasperlen (0.1 mm Ø für Anacystis, 0.3 mm Ø für Chlorella und 0.3 + 0.5 mm Ø gemischt für Petroselinum) in einer Zellmühle ("Vibrogen"), Firma Bühler, Tübingen, unter Kühlung geschüttelt. Das Homogenat wurde mit Hilfe einer Glasfritte von den Perlen befreit, mit einem gleichen Volumen puffergesättigten Phenols versetzt, für 5 min geschüttelt und die wässrige Phase durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Phenolphase wurde nochmals mit Tris-Puffer (pH 7.5 bzw. 9.0) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Überstände wurden mit dem 2-3fachen Volumen Äthanol (99%) versetzt. Der nach minimal 4 h entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Äthanol gewaschen und in Phosphatpuffer (0.05 m, pH 6.7; 0.1 m NaCl) gelöst. Diese Lösung der Gesamtnucleinsäuren diente als Ausgangsmaterial für die nachfolgende säulenchromatographische Auftrennung.

5. Säulenchromatographie an methyliertem Serumalbumin

Die in NaCl-haltigem Phosphatpuffer gelösten Nucleinsäuren wurden an einer Säule (1.8 x 10.5 cm) aus methyliertem Serumalbumin mit Kieselgur als Trägersubstanz adsorbiert (MANDELL

---

[1] = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

u. HERSHEY 1960; RICHTER & SENGER 1964). Zur Erzielung guter Trennungen darf die Säule maximal mit 2.5-3.0 mg Nucleinsäuren (berechnet nach der optischen Dichte der Lösung bei 260 nm; s.S.8) beladen werden. Mit Hilfe eines NaCl-Gradienten von 0.1 m gegen 1.5 m NaCl werden die einzelnen Nucleinsäurekomponenten nacheinander von der Säule eluiert. Der Vorgang wird durch automatische Vermessung und Registrierung der UV-Absorption bei 254 nm kontinuierlich verfolgt. Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgeteilt. Die Aktivität der bei Markierungsversuchen anfallenden ^{32}P-Nucleinsäuren wurde im Eluat ebenfalls fortlaufend und automatisch mit einem Fensterzählrohr in Verbindung mit dem Ratemeter FH 49a (Frieseke u. Hoepfner, Erlangen) registriert. War ^{3}H-Uridin als markierte Vorstufe verwendet worden, so wurde von jeder gesammelten Fraktion 0.1 ml auf ein Papierblättchen aufpipettiert, dieses getrocknet und die ^{3}H-Aktivität im Szintillationsspektrometer (Packard "Tricarb") gezählt. Die Szintillationsflüssigkeit bestand aus PPO und POPOP (vgl. S. 9) in Toluol.

6. Alkalische Hydrolyse und Säulenchromatographie an Dowex

Die in den gesammelten Fraktionen angereicherten RNS-Komponenten wurden durch Zugabe von Trägerprotein und $HClO_4$ (Endkonzentration 5%) ausgefällt und anschließend mit 0.5 n KOH bei 37°C für 18-20 h hydrolysiert. Danach erfolgte die Entfernung von säureunlöslichem Material einschließlich des Trägerproteins durch erneute Zugabe von $HClO_4$; im Überstand verblieben die säurelöslichen Mononucleotide. Er wurde nach Neutralisation vorsichtig in die oberste Schicht einer Dowex-Säule (1.8 x 15 cm; Dowex 1x2, 200-400 mesh, Cl^-Form) eingerührt. Die Elution der Nucleotide erfolgte durch einen geteilten Konzentrationsgradienten von H_2O gegen 0.05 n HCl; nach 18 Fraktionen (je 5.0 ml) wurde letztere durch 0.1 n HCl im Vorratsgefäß ersetzt. Die Registrierung von UV-Absorption bzw. ^{32}P-Radioaktivität und die Fraktionierung er-

folgten in gleicher Weise wie bei der MAK-Säulenchromatographie.

7. Gelfiltration der DNS an Sepharose

Etwa 400 ml Sepharose-Suspension wurden mit Phosphatpuffer (0.05 m Phosphat, 0.001 $MgSO_4$, pH 6.7) 3 bis 4 mal auf einer Fritte gewaschen, in Phosphatpuffer suspendiert und in ein Chromatographierohr (2.5 x 70 cm) eingefüllt. Nach Waschen mit weiteren 200 ml des gleichen Puffergemischs war die Säule gebrauchsfertig. Sie konnte nach vorangegangener Waschung für mehrere Trennungen benützt werden.

Der Nucleinsäureextrakt mußte für die Gelfiltration eingeengt werden. Hierfür erwies sich das Verfahren von DRACH & LINGREL (1966) als besonders geeignet. Dabei werden die gelösten Nucleinsäuren gegen eine 30%ige Dextranlösung (Dextran T80 in Phosphatpuffer 0.05 m, pH 6.7) für 10 h dialysiert. Die auf maximal 4.0 ml eingeengte Fraktion wurde mit Hilfe einer Injektionsspritze vorsichtig auf das Gelbett geschichtet. Die Eluierung erfolgte mit dem oben genannten Puffergemisch (Durchflußgeschwindigkeit 15 bis 25 ml/h). Die UV-Absorption wurde für 254 nm fortlaufend registriert, Proben von 5.0 ml gesammelt (vgl. S.7).

8. Berechnungen

Die Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration beruht auf der Vermessung der Extinktion bei 260 nm im Spektralphotometer. 1 optische Einheit (= optische Dichte von 1.0) entspricht 20 µg Nucleinsäuren in 1 ml Lösung.

Für das arithmetische Mittel $\bar{x}$ gilt folgende Beziehung:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i$$

9. Abkürzungen

hmRNS:	hochmolekulare RNS
EDTA:	Äthylendiamintetraacetat
AMP:	Adenosinmonophosphat
CMP:	Cytidinmonophosphat
GMP:	Guanosinmonophosphat
UMP:	Uridinmonophosphat
MAK:	methyliertes Albumin + Kieselgur
pcv:	gepacktes Zellvolumen (Hämatokritmethode)

10. Chemikalien

Trägerfreies ^{32}P-Orthophosphat und (5-^{3}H)-Uridin waren Präparate von The Radiochemical Centre Amersham, England. Dextran T80 und Sepharose 4B lieferte Pharmacia, Uppsala, Serumalbumin (Rinderserum, Fraktion V) die California Corporation for Biochemical Research, Luzern. Von der Firma Serva (Entwicklungslabor, Heidelberg) kam: Dowex (1x2, 200-400 mesh, Chloridform). Von Packard stammten PPO (2,5-Diphenyloxazol) und POPOP (1,4-bis-(4-Methyl-5-Phenyloxazol)-Benzol). Bei allen übrigen Substanzen handelte es sich um p.A. Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt.

ERGEBNISSE

I. Charakterisierung der Nucleinsäuren aus Normalzellen von Anacystis

Das Eluierungsdiagramm der Nucleinsäuren einer Gesamtpräparation aus Zellen von Anacystis nidulans ist in Abb.1 wiedergegeben. Es gliedert sich in 3 Hauptkomponenten: lösliche RNS, DNS und hochmolekulare (ribosomale) RNS (hmRNS). Im Gegensatz zu den Grünalgen (vgl. Abb.4a) besteht die hmRNS bei Blaualgen nur aus 2 Komponenten: 16S und 23S. Für die fädige Cyanophycee Plectonema boryanum wurde ein völlig identisches Bild erhalten. Dieses für Anacystis typische Eluierungsdiagramm der Nucleinsäuren stimmt mit dem der Bakterien überein und darf für alle Prokaryonten als charakteristisch angesehen werden.

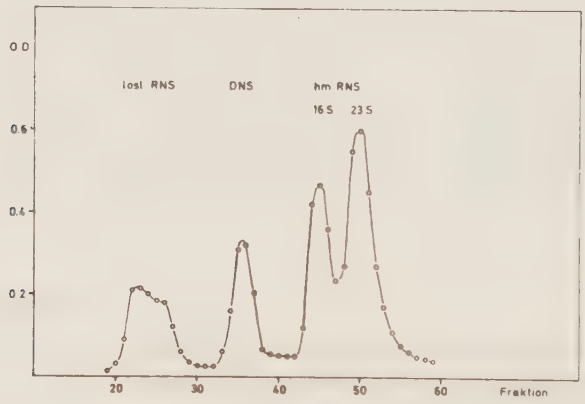
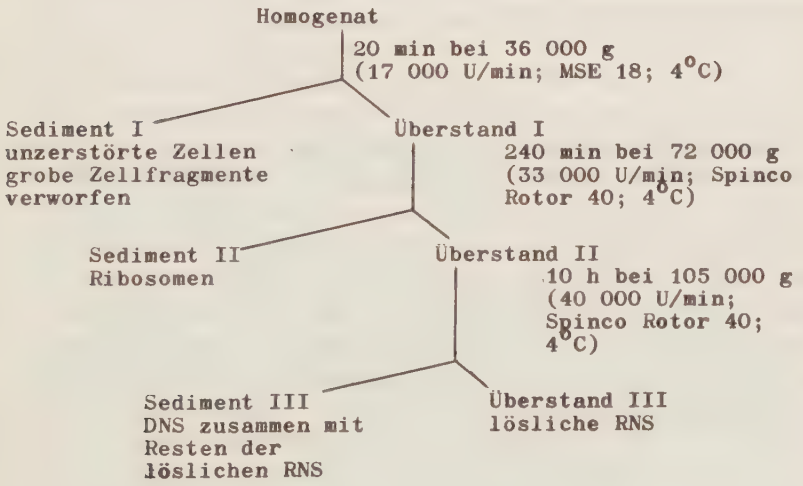


Abb.1: Fraktionierung der Gesamtnucleinsäuren aus Anacystis an MAK. Gemessen wurde die optische Dichte (o.D.) bei 254 nm.

Die lösliche RNS ist nicht einheitlich, wobei die Hauptmasse nicht partikelgebundene RNS darstellt. Der als Schulter erscheinende Anteil wurde von SIDDIQUI und HOSOKAWA (1968) als 5S-Komponente ribosomalen Ursprungs identifiziert. Bei der Zentrifugation von Zellhomogenaten findet sich diese 5S-Komponente immer in der Ribosomenfraktion (siehe Abb. 10, Seite 21; HEMLEBEN-VIELHABEN 1966; GALLING 1967).

Fraktionierende Zentrifugation von Zellhomogenaten

Das Verfahren der Zentrifugation wurde benützt, um 1. die 5S-Komponente von der löslichen RNS abzutrennen und um 2. nachzuprüfen, ob im Mg-Mangelzustand nicht-partikelgebundene hmRNS in der Überstandsfraktion erscheint. Sie erwies sich außerdem als unerläßlich, um die bei Kurzzeitmarkierung auftretenden radioaktiven Polyphosphate von der löslichen RNS abzutrennen. Die einzelnen Arbeitsgänge sind im folgenden Schema zusammengefaßt:



Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend wie auf Seite 6 beschrieben extrahiert. Aus Sediment I lassen sich in geringer Ausbeute alle typischen Nucleinsäurekomponenten isolieren. Sediment II (=Ribosomen) liefert die Hauptmasse an hmRNS sowie die 5S-Komponente (siehe Abb. 10). Überstand II enthält DNS und lösliche RNS (siehe Abb. 11). In einem 3. Zentrifugationsschritt gelingt dann die Trennung dieser beiden Komponenten, wobei die lösliche RNS im Überstand bleibt, DNS hingegen mit einem geringen Teil löslicher RNS im Sediment niedergeschlagen wird.

II. Allgemeine Effekte der Mg-Verarmung

1. Wachstum und mikroskopisches Bild

Eine Normalkultur von Anacystis wächst über 3 Tage optimal. Nach dieser Zeit erreicht die Zellvermehrung eine stationäre Phase, äußerlich erkennbar am Farbumschlag der Suspension von blaugrün nach gelbgrün.

Die Überführung der Zellen in den Mangelzustand erfolgt in 2 Schritten (siehe Seite 4). In den ersten 24 Stunden stehen ihnen noch 10% der normalen Mg-Menge zur Verfügung. In diesem Stadium finden noch Zellteilungen statt, möglicherweise werden dabei die Mg-Reserven der Zellen aufgebraucht. Nach dieser Phase werden die Algen in Mg-freies Nährmedium überführt. Die Vorkultur hat sich insofern bewährt, als die Organismen ihr Wachstum beibehalten und gleichzeitig den Mg-Überschuß beseitigen. Der Mangelzustand tritt in der zweiten Phase sofort ein: eine Vermehrung der Zellmasse ist nicht mehr festzustellen (Abb. 2).

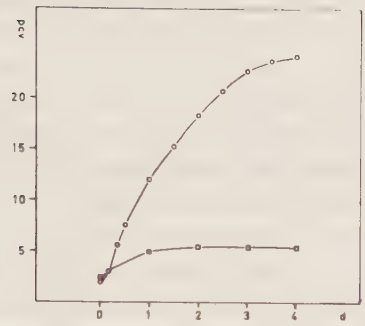


Abb. 2: Wachstumskurve. Bestimmung des gepackten Zellvolumens (pcv = packed cell volume) mit der Hämatokritmethode. 100 Skalenteile ≙ 0.04 ccm.
o—o Normalkultur, □—□ Mangelkultur.

Der Mangelzustand wird im mikroskopischen Bild durch das Auftreten fadenförmiger, unseptierter Riesenzellen angezeigt, die auch nach Mangan-Mangel bei dem selben Organismus auftreten (RICHTER 1961).

2. Auswirkungen des Mg-Entzugs auf die Komponenten der Nucleinsäuren

Anacystis: Wird die Zusammensetzung der Nucleinsäuren für 4 verschieden weit fortgeschrittene Mg-Mangelstadien analysiert (Abb. 3a-d), so zeigt sich, daß vor allem Veränderungen der löslichen und hochmolekularen RNS auftreten. Die letztere mit ihrem 16S und 23S-Anteil wird mit fortschreitendem Mangel immer mehr reduziert, die lösliche RNS dagegen nimmt deutlich zu. Die DNS scheint am wenigsten beeinflußt zu werden. Es ist dabei hervorzuheben, daß die beschriebene Verteilung der RNS nach Mg-Mangel nur relativ ist. Die Ausbeute an löslicher RNS für verschiedene

Mangelstadien kann nicht auf die eingesetzte Zellmasse bezogen werden, weil die Zellgröße in Abwesenheit von Mg^{2+} stark zunimmt.

Bei Zellen, die 72 h in Mg-freiem Medium kultiviert wurden, waren nur noch sehr geringe Reste ribosomaler RNS nachzuweisen. Interessanterweise erholen sich solche Zellen relativ schnell und besitzen schon nach 48 h Kultur in Vollmedium eine normale Nucleinsäuregarnitur.

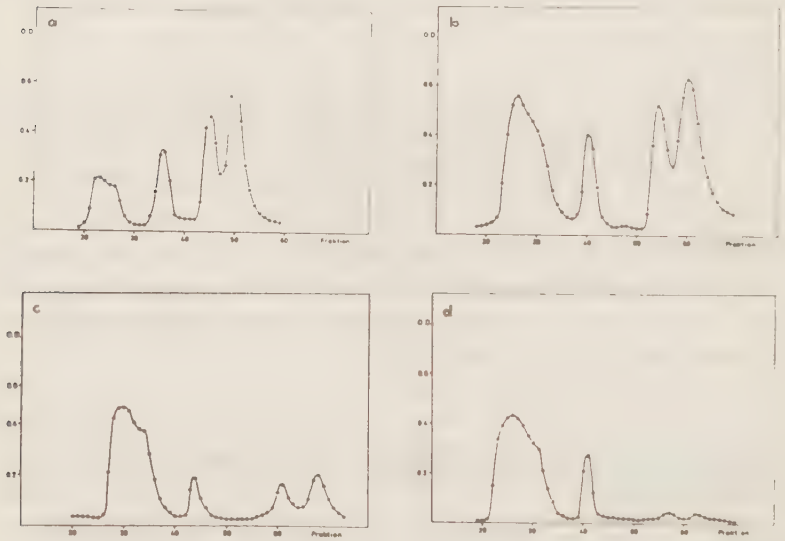


Abb.3: Auswirkung des Mg-Mangels auf die Nucleinsäuren von Anacystis. Säulenchromatographie an MAK. a) Normalkultur, b) 24 h Vorkultur mit 10% Mg, 24 h Mg-freies Medium, c) 24 h Vorkultur mit 10% Mg, 48 h Mg-freies Medium, d) 24 h Vorkultur mit 10% Mg, 72 h Mg-freies Medium.

Chlorella: Die Zusammensetzung der Nucleinsäuren ist bei Grünalgen vielfältiger als bei Blaualgen und Bakterien. Die ribosomale RNS besteht aus mindestens 4 Komponenten, von denen 2 als deutliche Maxima, 2 als Schulter im UV-Profil in Erscheinung treten (Abb. 4a). Analog zu den Mangeleffekten bei Anacystis wird bei Chlorellazellen nach Verarmung an Mg^{2+} die Menge der ribosomalen RNS deutlich vermindert; bezogen auf die übrigen Komponenten nimmt die lösliche RNS stark zu. Im Vergleich zu Blaualgen wirkt sich bei Chlorella der Mg-Entzug verhältnismäßig spät aus. Es könnte sein, daß dieser Organismus größere zelluläre Reserven an Mg^{2+} besitzt oder einen geringeren Bedarf hat.

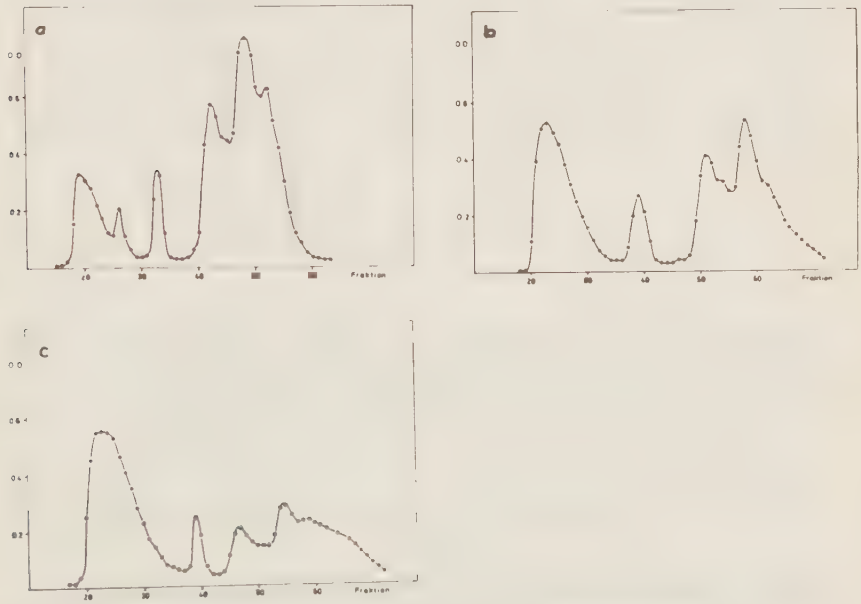


Abb. 4: Auswirkung des Mg-Mangels auf die Nucleinsäuren von Chlorella. Säulenchromatographie an MAK. a) Normalkultur, b) 24 h Vorkultur mit 10% Mg, 24 h Mg-freies Medium, c) 24 h Vorkultur mit 10% Mg, 72 h Mg-freies Medium.

In Abb. 4a-c kommt zum Ausdruck, daß die 5S-Komponente ribosomalen Ursprungs nicht mehr getrennt eluiert wird; sie fehlt entweder oder wird von der vermehrten löslichen RNS überdeckt.

Petroselinum: Die Säulenchromatographie der Nucleinsäuren an MAK ergibt für Kalluszellen im Bereich der löslichen RNS und der DNS ein ähnliches Bild wie bei der Grünalge Chlorella. Was die hmRNS betrifft, so gelingt die Auftrennug hier weniger gut als bei den oben genannten Organismen: es treten lediglich 2 Komponenten in Erscheinung. Unter dem Einfluß des Mg-Mangels nimmt auch bei Petroselinum die ribosomale RNS ab. Auf den Gehalt an löslicher RNS hat der Entzug des Mg^{2+} keinen Einfluß (vgl. die Ausbeuten in Abb. 5a und 5b; bei den betreffenden Experimenten wurde gleich viel Zellmaterial verarbeitet). Bis zum Auftreten der ersten Mangeleffekte vergehen bei Zellen einer Suspensionskultur 5 bis 7 Tage.

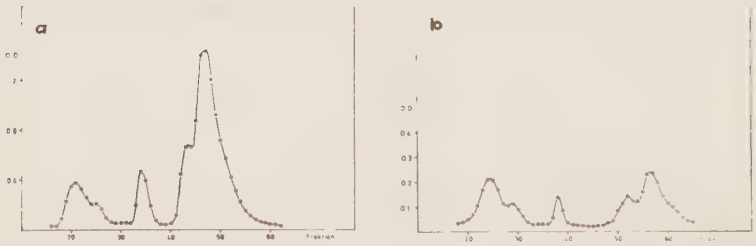


Abb. 5: Einfluß des Mg-Entzugs auf die Nucleinsäuren von Petroselinum. Säulenchromatographie an MAK.
a) Normalkultur, b) Mg-Mangelkultur (14 Tage Mg-freies Medium).

3. Quantitative Beziehung hmRNS : lösliche RNS

Wie oben gezeigt wurde, ändert sich das Mengenverhältnis von hmRNS zu löslicher RNS unter Mangelbedingungen erheblich. Nach Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren an MAK wurde auf Grund der UV-Absorption bei 260 nm die absolute Menge beider Fraktionen im Eluat bestimmt und daraus ein Quotient $Q = \frac{\text{hmRNS}}{\text{lösliche RNS}}$ berechnet. Abb. 6 zeigt die erhaltenen Werte für eine Kultur von Anacystis, die über 5 Tage im Mg-Mangel beobachtet wurde.

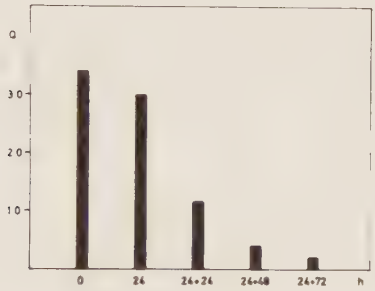


Abb. 6: Das Mengenverhältnis von hmRNS zu löslicher RNS in Zellen von Anacystis bei fortschreitendem Mg-Mangel. Abszisse: Kulturdauer in Stunden, Ordinate: Quotient Q (siehe Text). Während der ersten 24 h enthielt das Medium noch 10% der normalen Mg-Menge.

III. Einbau radioaktiv markierter Vorstufen

Die Inkubation der Zellen mit radioaktiv markierten Nucleinsäurevorstufen gibt Aufschluß über die Bildungsrate der verschiedenen Nucleinsäuren. Je nach Inkubationszeit werden nur einige schnell synthetisierte Komponenten oder aber alle Nucleinsäuren radioaktiv markiert.

1. ^{3}H-Uridin als Vorstufe der RNS

Die Verwendung von Uridin als "tracer" bei Anacystis bietet den Vorteil, daß es von den Zellen sehr schnell aufgenommen und in den Stoffwechsel eingeschleust wird. Da Uridin in der DNS nicht vorkommt, darf angenommen werden, daß es selektiv in RNS-Komponenten eingebaut wird.

Markierungsexperimente mit Normalzellen von Anacystis

Abb. 7-9 zeigen die Ergebnisse einer Versuchsreihe, in der die Inkubationszeit mit ^{3}H-Uridin von 1 h bis 1 min variiert wurde. Nach 1-stündiger Inkubation sind alle Nucleinsäurekomponenten markiert. Dabei ist hervorzuheben, daß mit Ausnahme der DNS-Region die Maxima des Aktivitätsprofils mit denen der UV-Absorption in ihrer Lage übereinstimmen.

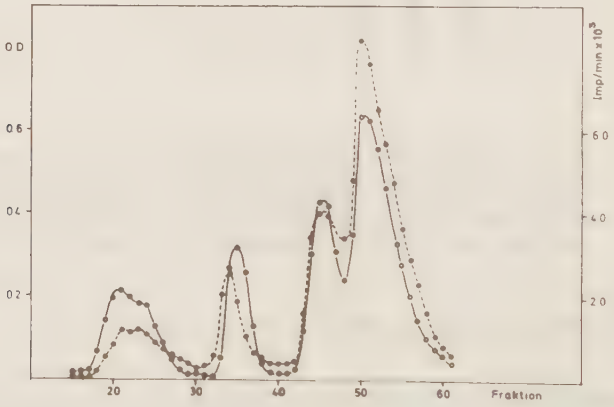


Abb. 7: MAK-Trennung eines Gesamtextrakts der Nucleinsäuren. Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin über 1 h. o——o Absorption bei 254 nm, ●-----● ^{3}H-Radioaktivität.

Abb. 8 stellt das Ergebnis eines Experiments dar, in welchem den Zellen für 30 min ^{3}H-Uridin geboten wurde. Im Bereich der hmRNS liegen die Maxima im Aktivitätsprofil nicht koinzident mit denen der UV-Absorption; die zugehörigen markierten Komponenten werden früher, d.h. bei einer etwas niedrigeren NaCl-Konzentration eluiert. Zunächst unverstanden ist der starke Einbau in die DNS (zur Natur dieser Fraktion siehe S.21f).

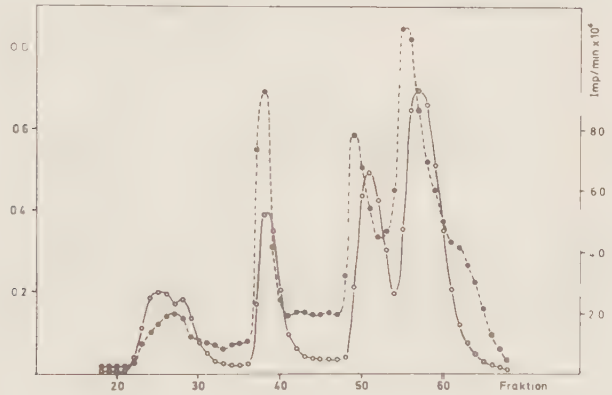


Abb. 8: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren aus Anacystis nach Inkubation der Zellen mit 3H-Uridin über 30 min. o——o Absorption bei 254 nm, ●-----● ^{3}H-Radioaktivität.

Sämtliche Pulse-Experimente mit einer Dauer von 10 sec bis 2 min sind dadurch gekennzeichnet, daß die Radioaktivität im Eluierungsdiagramm in sehr breiter Verteilung vorliegt (Abb. 9). Es treten Bereiche mit hoher spezifischer Aktivität auf: die Fraktionen zwischen DNS und hmRNS, welche praktisch keine UV-Absorption aufweisen, und die absteigende Flanke der hmRNS. Sehr deutlich erscheint unter diesen Bedingungen eine Aktivitätsschulter in der letztgenannten Region. Die lösliche RNS enthält nach dieser Kurzzeit-

markierung wenig ^{3}H-Radioaktivität.

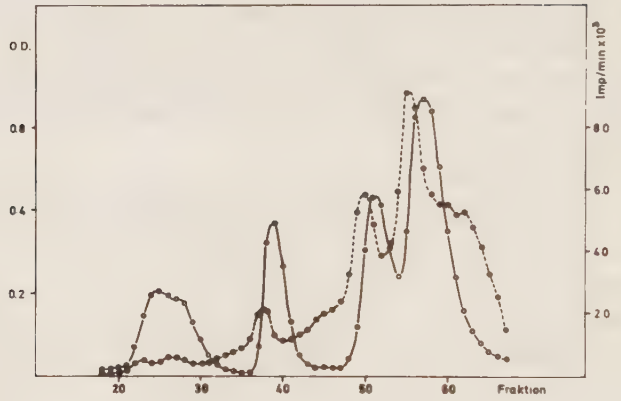


Abb. 9: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren von Anacystis nach Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin über 1 min. o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

Fraktionierende Zentrifugation von Zellhomogenaten

Bei der sofortigen Extraktion der Nucleinsäuren aus dem Zellhomogenat, wie sie in den bisher geschilderten Versuchen vorgenommen wurde, waren Aussagen über deren Bindung an definierte Zellstrukturen nicht möglich. Innerhalb gewisser Grenzen erhält man hierüber eine Auskunft, wenn man das Homogenat einer fraktionierenden Zentrifugation unterwirft.

Bei diesen Experimenten wurden Homogenate aus Zellen, die kurzfristig und langfristig ^{3}H-Uridin eingebaut hatten, vergleichend untersucht. Dabei galt das besondere Interesse der Frage, ob schnell markierte RNS frei und bzw. oder an Partikeln gebunden vorliegt. Die technische Durchführung ist bereits beschrieben worden (siehe Seite 11).

1-stündiger Einbau von ^{3}H-Uridin: Bei MAK-Chromatographie der aus der Ribosomenfraktion (Sediment II, siehe Seite 11) extrahierbaren Nucleinsäuren besteht eine klare Koinzidenz der Maxima von UV-Absorption und Radioaktivität (Abb. 10). Das gleiche gilt für die Überstandsfraktion (Abb. 11). Die 5S-Komponente der Ribosomen erscheint vergleichsweise nur schwach markiert (Abb. 10); eine entsprechende Beobachtung machte GALLING (1967) bei Chlorella. Der überwiegende Teil der im Gesamtextrakt im Bereich der hmRNS auftretenden Radioaktivität ist, wie dieser Versuch zeigt, fest an die Ribosomen gebunden.

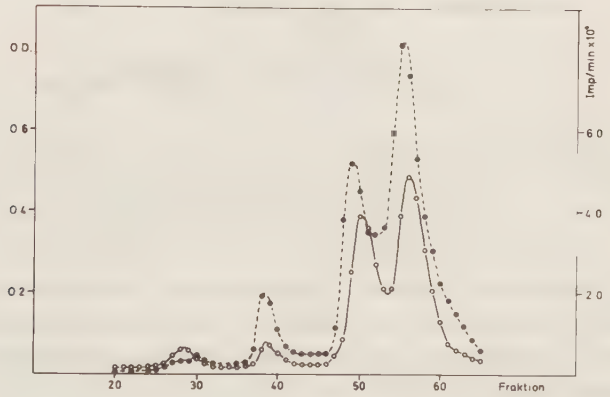


Abb. 10: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Anacystis aus dem Sediment II (Ribosomenfraktion) nach Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin über 1 h. o——o Absorption bei 254 nm, ●- - -● ^{3}H-Radioaktivität.

In allen bisher besprochenen Experimenten, in denen ^{3}H-Uridin als Vorstufe eingesetzt wurde, erschien Radioaktivität im DNS-Bereich. Danach wäre zu vermuten, daß es sich um RNS handelt, die gemeinsam mit der DNS von der MAK-Säule eluiert wird. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die RNS Teil

eines stabilen DNS-RNS-Komplexes ist. Mit Hilfe der Gelfiltration, wie sie BEIDERBECK (1968) angegeben hat, lassen sich Moleküle verschiedener Größe trennen. Dieses Verfahren er-

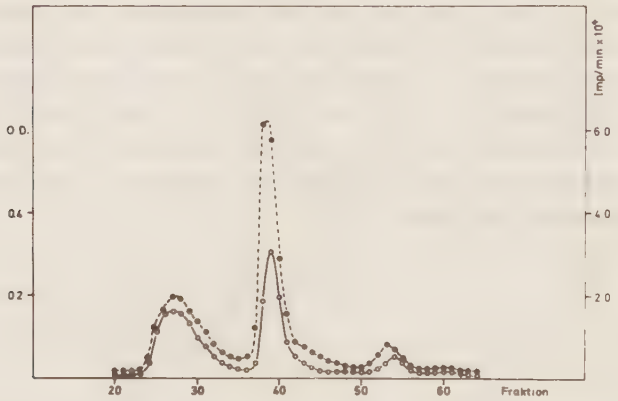


Abb. 11: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Anacystis aus der Überstandsfraktion (Überstand II) nach Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin über 1 h. o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

möglicht eine Klärung des genannten Problems. Ist die RNS nicht komplex an die DNS gebunden, müssen auf der Sepharose-Säule Komponenten mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit auftreten. Bei der verwendeten Säule aus Sepharose 4B wird DNS bei Fraktion 20 eluiert (Fraktionen zu 5.0 ml); RNS-komponenten erscheinen im Bereich der Fraktionen 50-70. Abb. 12 zeigt das Ergebnis einer Gelfiltration an Sepharose 4B für die komponenten der DNS-Region nach vorangegangener säulenchromatographischer Trennung der Nucleinsäuren aus dem Überstand II an MAK. Diese stammten aus Zellen, denen 1 h ^{3}H-Uridin geboten worden war. Die markierte DNS erscheint vorwiegend bei Fraktion 20, eine ^{3}H-RNS in den Fraktionen 52-62. Der Anteil dieser RNS an der Gesamtaktivität ist sehr gering. Bei Pulse-Experimenten (Einbauzeiten von 1, 5, 10 und 15 min) ist diese Fraktion

nicht nachweisbar. Die kritische Inkubationsdauer beträgt ca 30 min. Die Komponente bei Fraktion 20 ist DNase-labil,

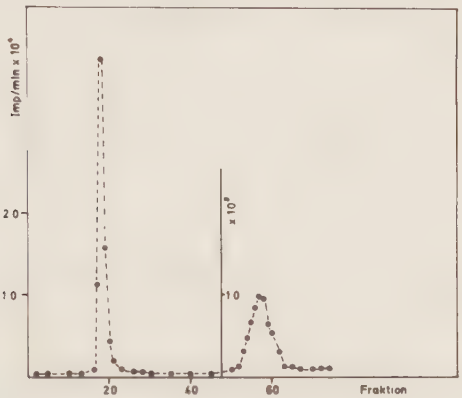


Abb. 12: Gelfiltration der Nucleinsäuren des DNS-Bereichs an Sepharose 4B. 1-stündige Inkubation mit ^{3}H-Uridin. ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

sie muß also mit der DNS identisch sein. Die DNS enthält überraschenderweise die Hauptmenge der Radioaktivität, obwohl ^{3}H-Uridin als Vorstufe eingesetzt wurde. Dieser Befund ist so zu erklären, daß in der Zelle eine Umwandlung von Uridin in Cytidin stattfindet. Daß diese Reaktion vorkommt, kann folgendermaßen bewiesen werden: Wird ^{3}H-Uridin-markierte hmRNS durch alkalische Hydrolyse gespalten, finden sich 25% der Gesamtaktivität des Hydrolysats im CMP. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei Chlorella pyrenoidosa (BEIDERBECK 1968).

Der Überstand II enthält neben der DNS und der löslichen RNS eine weitere markierte Komponente, die mit der gleichen NaCl-konzentration wie die ribosomale RNS von der MAK-Säule eluiert wird (Abb. 11, Fraktion 51-55). Um zu klären, ob es sich hierbei um 16S- oder 23S-RNS handelt, wurde diese markierte Komponente mit unmarkierter 23S-RNS gemischt und an

MAK rechromatographiert. Aus Abb. 13 geht hervor, daß die Aktivität im Bereich der 16S-RNS auftritt, d.h. ein geringer 16S-RNS-Anteil geht in den Überstand II. Es ist wahrscheinlich, daß die unmarkierte 23S-RNS nicht ganz frei von 16S-RNS war und deshalb die UV-Absorption im 16S-Bereich zu hoch erscheint.

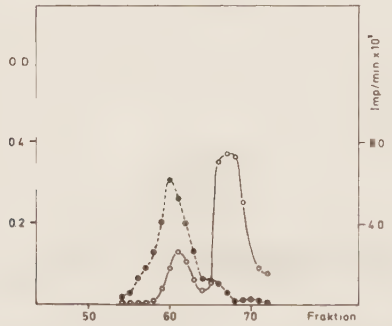


Abb. 13: MAK-Rechromatographie einer ^{3}H-Uridin markierten hmRNS der Überstandsfraktion II gemischt mit unmarkierter 23S hmRNS. o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

Pulse-Experimente mit ^{3}H-Uridin: In Verbindung mit Pulse-Markierungsexperimenten war es besonders wichtig, nachzuprüfen, ob die schnell markierte RNS an bestimmte Zellorganelle gebunden ist. Wie Abb. 14 (Sediment II, siehe Seite 11) zeigt, entspricht die Verteilung der Radioaktivität etwa der im Gesamtextrakt. Im Vergleich dazu ist für den zugehörigen Überstand II (Abb. 15) eine relativ starke Markierung der DNS charakteristisch. Obwohl die hmRNS bis auf einen sehr geringen Rest der 16S-Komponente abgetrennt wurde, ist in diesem Bereich noch ein deutliches Maximum im Radioaktivitätsprofil feststellbar. Offensichtlich ist ein Teil der schnell markierten RNS nicht an Ribosomen gebunden.

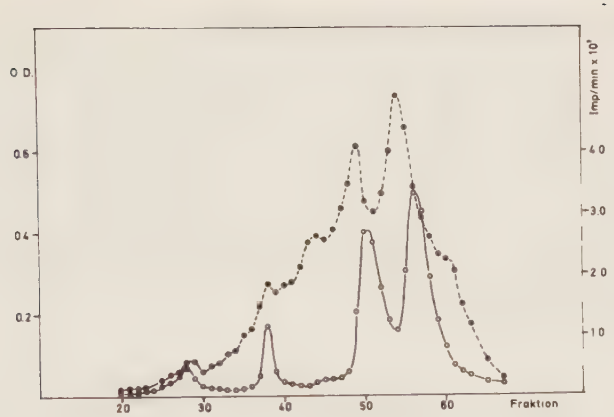


Abb. 14: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Anacystis aus dem Sediment II (Ribosomenfraktion) nach Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin über 1 min.
o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

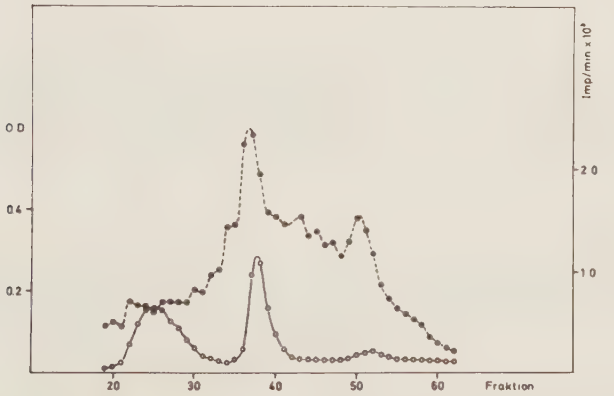


Abb. 15: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Anacystis aus der Überstandsfraktion (Überstand II) nach Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin über 1 min.
o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

Einbauexperimente an Mg-Mangelzellen

Wie in Abb. 2, 3 und 4 dargestellt ist, wird die Menge der hmRNS unter Mangelbedingungen stark reduziert. Der Grad dieser Abnahme und die Zeit bis zum Erreichen des extremen Mangelzustandes variiert bei den einzelnen untersuchten Organismen. Die Menge der löslichen RNS nimmt bei Mg-Entzug relativ gesehen zu. Nachfolgend werden Einbauexperimente mit radioaktiv markiertem Uridin an Mg-verarmten Zellen von Anacystis beschrieben.

Zunächst war zu prüfen, in wieweit die Kulturdauer im Mg-freien Medium die Einbaurate von ^{3}H-Uridin in die Nucleinsäuren beeinflußt. Es ergab sich, daß gleichgültig wie lange die Zellen in Mg-freiem Medium kultiviert wurden (24 h Vorkultur mit 10% der normalen Mg-Menge, 24h, 48h bzw. 72h ohne Mg), die Profile der Radioaktivität nach Auftrennung an MAK identisch waren. Unterschiede bestanden nur in der Höhe des Gesamteinbaus: bei fortschreitendem Mangel fixieren die Zellen weniger radioaktives Uridin bezogen auf ihren Nucleinsäuregehalt. Die hier wiedergegebenen Versuche entstanden unter folgenden Bedingungen: Nach einer 24-stündigen Vorkultur mit 10% der normalen Mg-Menge wurde den Zellen für weitere 48h das Mg völlig entzogen.

1-stündiger Einbau von ^{3}H-Uridin: Bei diesem Versuch fällt besonders auf, daß die hmRNS trotz ihrer starken Mengenabnahme sehr viel radioaktives Material fixiert, wie bei Normalzellen weist die 23S-Komponente die höhere Einbaurate auf (Abb. 16). In die lösliche RNS wird unter diesen Mangelbedingungen am wenigsten ^{3}H-Uridin eingebaut.

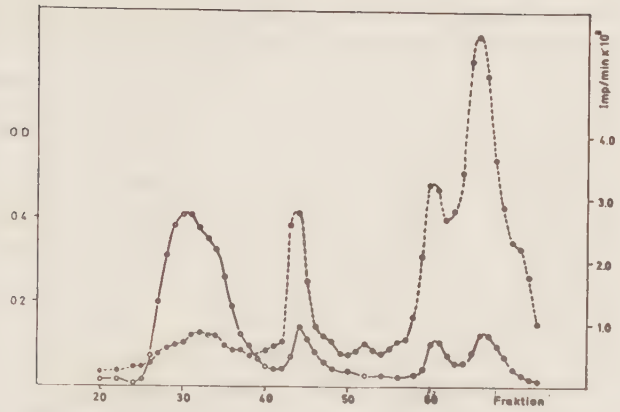


Abb. 16: MAk-Trennung der Gesamtnucleinsäuren aus Anacystis. 24h Vorkultur in 10% der normalen Mg-Menge, 48h ohne Mg. Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin über 1h. o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

Pulse-Experimente mit ^{3}H-Uridin: Abb. 17 zeigt das MAk-Elutionsdiagramm der Nucleinsäuren, die aus Mangelzellen nach Pulse-Markierung isoliert wurden. Die Verteilung der Radioaktivität im Bereich der hmRNS ist im Vergleich zu Normalzellen weniger heterogen. Vor allem fehlt die Schulter über der absteigenden Flanke des UV-Maximums der 23S-RNS im MAk-Chromatogramm völlig. Dasselbe Bild einer relativ klaren Aktivitätsverteilung wird bei extrem kurz inkubierten (5 sec) Normalzellen erhalten.

Die strukturelle Bindung schnell markierter RNS: Mit Hilfe der fraktionierenden Zentrifugation konnte an Homogenaten von markierten Normalzellen gezeigt werden, daß nach 1-stündigem Einbau von ^{3}H-Uridin nahezu die gesamte in der hmRNS fixierte Radioaktivität mit den Ribosomen assoziiert

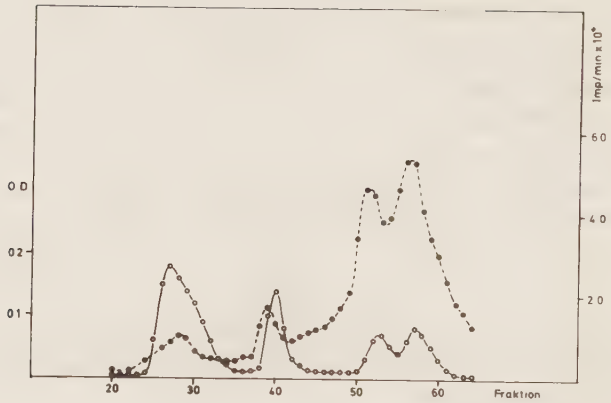


Abb. 17: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren aus Anacystis. 24h Vorkultur mit 10% der normalen Mg-Menge, 48h ohne Mg. Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin über 1 min. o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

ist. Auch bei Kurzzeitmarkierung war der größte Teil der schnell markierten RNS mit den Ribosomen sedimentierbar; die MAK-Trennung der Nucleinsäuren aus der Überstandsfraktion ergab jedoch, daß sich ein breites Aktivitätsmaximum vom DNS-Bereich in die Region der hmRNS erstreckte (siehe Abb. 14 bzw. 15).

1-stündige Inkubation: Nach vorangegangener, fraktionierender Zentrifugation des Homogenats von Mg-Mangelzellen, die 1h mit ^{3}H-Uridin inkubiert worden waren, ergibt sich eine Übereinstimmung mit Normalzellen hinsichtlich der Verteilung der Radioaktivität unter den einzelnen Komponenten der Nucleinsäuren. Im Sediment II (Abb. 18) finden sich die Reste der ribosomalen 16S und 23S Komponente mit relativ hoher Markierung; im Überstand (Abb. 19) findet sich die Masse der Radioaktivität im DNS-Bereich, kleinere Anteile in

der löslichen RNS bzw. in der hmRNS. Da bei der letzteren dem Aktivitätsmaximum kein deutlicher UV-Gipfel entspricht, muß es sich um eine Komponente mit hoher spezifischer Aktivität handeln.

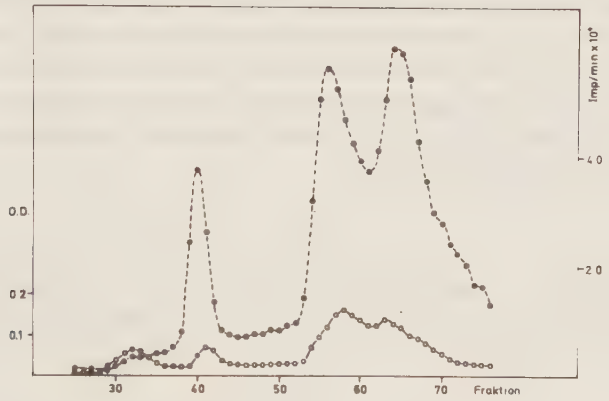


Abb. 18: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Anacystis Mangelzellen aus dem Sediment II (Ribosomenfraktion). 24h Vorkultur mit 10% der normalen Mg-Menge, 48h ohne Mg. Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin für 1h. o——o Absorption bei 254 nm, ●---● Radioaktivität.

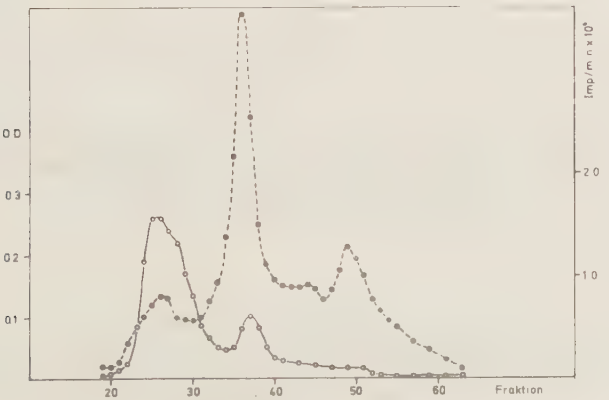


Abb. 19: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Anacystis Mangel-Zellen aus dem Überstand II. Kultur und Inkubation wie unter Abb. 18.o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

Kurzzeitmarkierung: Säulenchromatographie der Nucleinsäuren aus Sediment II an MAK ergibt ein sehr ähnliches Verteilungsmuster für die Radioaktivität wie die entsprechende Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren (siehe Abb. 17); daher ist nur das Diagramm für den Überstand II wiedergegeben (Abb. 20). Es zeigt eine breit gestreute Verteilung der Radioaktivität. Ein deutlich ausgebildetes Maximum koinzidiert mit dem UV-Gipfel der DNS. Die Menge der nicht partikelgebundenen hmRNS, die bei der entsprechenden Überstandsfraktion in den Fraktionen 50-70 eluiert wird, erfährt unter Mg-Mangelbedingungen keine Zunahme.

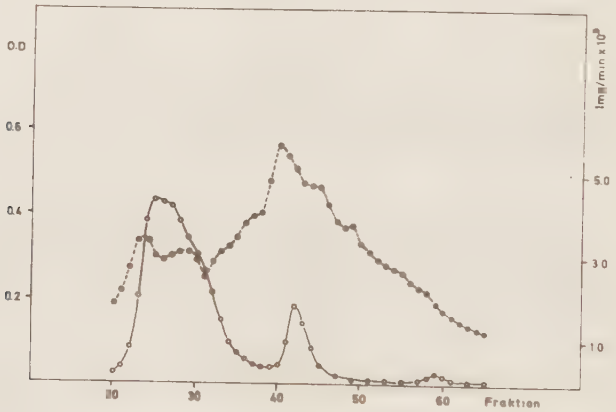


Abb. 20: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Anacystis Mangelzellen aus dem Überstand II. Kultur und Inkubation wie unter Abb. 17. o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

2. Markierungsexperimente mit ^{32}P-Orthophosphat

Radioaktiv markiertes Orthophosphat wird als Vorstufe bei der Biosynthese aller Nucleinsäuren verwendet. Der Vorteil dieser Markierungstechnik besteht darin, daß mit Hilfe alkalischer Hydrolyse die Basenzusammensetzung der RNS bestimmt werden kann. Bei zeitlicher Variation des ^{32}P-Einbaus gelingt eine Charakterisierung schnell markierter RNS im Vergleich zu den Nucleinsäuren der Grundgarnitur. Die Basenzusammensetzung der letzteren ist daher als erstes ermittelt worden.

Markierungsexperimente mit Normalzellen

Langzeit-Einbau: Das Ziel dieser Versuche war, mit einem ^{32}P-Angebot über eine Zeitspanne, in der sich die Zellen mindestens 1 Mal geteilt haben, eine gleichmäßige, radio-

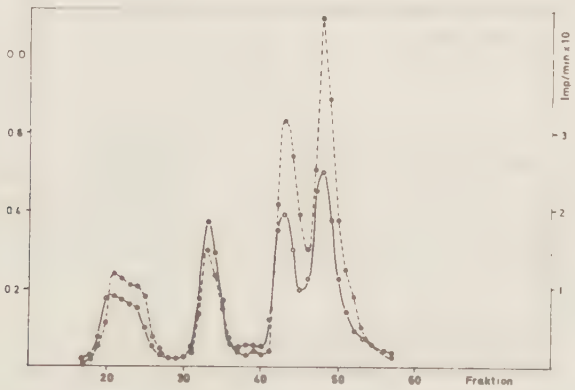


Abb. 21: Auftrennung der ^{32}P-markierten Nucleinsäuren an MAK. Inkubation mit 2.5 µC/ml ^{32}P-Orthophosphat für 15 h. o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{32}P-Radioaktivität.

aktive Markierung sämtlicher Nucleinsäuren zu erreichen. Die Zellen wurden bei diesen Versuchen 15 h lang in Gegenwart von ^{32}P-Orthophosphat (2.5 µC/ml) angezogen. Für die anschließend daraus isolierten Nucleinsäuren ist nach MAK-Chromatographie das in Abb. 21 dargestellte Eluierungsmuster charakteristisch. Aus ihm geht hervor, daß die Maxima für UV-Absorption und Radioaktivität jeweils bei der gleichen Fraktion erreicht werden. Die Langzeit-Markierungsversuche bringen gegenüber den Pulse-Experimenten den Vorteil, daß keine schnell markierten Polyphosphate im Eluierungsdiagramm auftreten. Diese sind für Anacystis bei kurzmarkierung mit ^{32}P-Orthophosphat typisch und werden später besprochen.

Die Basenzusammensetzung der einzelnen RNS-komponenten bei Langzeitmarkierung mit ^{32}P-Orthophosphat: Die durch MAK

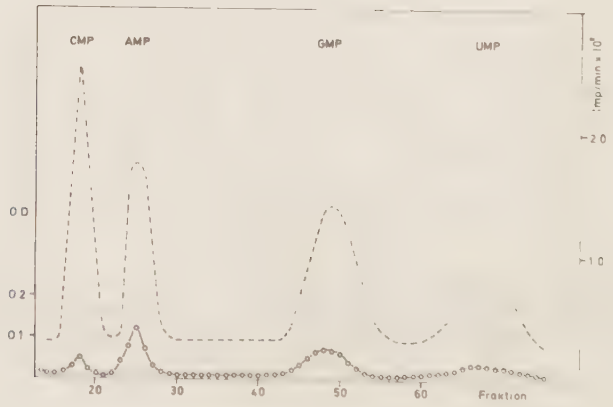
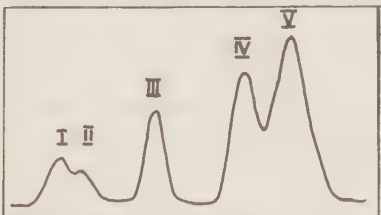


Abb. 22: Säulenchromatographische Trennung eines Alkalihydrolysats aus 16S-hmRNS an Dowex mit Hilfe eines HCl-Gradienten. o——o Absorption bei 254 nm, ●- - -● ^{32}P-Radioaktivität.

Chromatographie isolierten RNS-Komponenten wurden in einer alkalischen Hydrolyse gespalten (siehe Seite 7, Material und Methoden). Bei der Chromatographie des Hydrolysats wurden die entstandenen 2'-3'-Mononucleotide in folgender Reihenfolge eluiert: 2'-3'-CMP, 2'-3'-AMP, 2'-3'-GMP, 2'-3'-UMP (Abb. 22). Die den einzelnen Komponenten zugehörenden Eluatfraktionen wurden vereinigt, Proben auf Aluminiumplanchetten aufgetragen und nach Trocknung ihre Radioaktivität in einem Methandurchflußzähler (Frieseke und Höpfner) bestimmt. Hieraus wurde der prozentuale Anteil eines jeden Nucleotids berechnet (Tabelle I).

Tabelle I: Basenzusammensetzung der einzelnen RNS-Komponenten (in %). Bestimmung anhand des eingebauten ^{32}P-Orthophosphats nach alkalischer Hydrolyse (Einbauzeit 15 h im Licht).



Nucleinsäure-komponente	Ausgangs-präparation	CMP	AMP	GMP	UMP
I =lösliche RNS	isoliert[1]	30.1	20.3	31.6	18.0
II =5S-RNS	isoliert	28.9	23.2	28.6	19.3
III=DNS-assoz. RNS	Gesamt-extrakt[2]	24.4	20.8	30.2	24.6
	isoliert	26.5	20.7	32.7	20.1
IV =16S-hmRNS	Gesamt-extrakt	24.9	25.9	30.7	18.5
	isoliert	24.6	26.1	31.4	17.9
V =23S-hmRNS	Gesamt-extrakt	23.4	28.3	31.0	17.3
	isoliert	22.9	28.5	31.2	17.4

[1] durch fraktionierende Zentrifugation
[2] nach Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren an MAK

Die lösliche RNS ("Komponente I") enthält CMP und GMP zu etwa gleichen Teilen; zwischen den Anteilen an AMP und UMP besteht ein geringfügiger Unterschied. Damit unterscheidet sich die lösliche RNS aus Anacystis in ihrer Basenzusammensetzung von der gleichen Komponente aus Chlorella. GALLING u. RICHTER (1966) bzw. BEIDERBECK (1968) fanden für jene folgende Werte: CMP 29.4%, AMP 19.5%, GMP 35.0%, UMP 16.0%.

Die ribosomale Herkunft der 5S-Komponente ist auf Grund ihrer Sedimentierbarkeit mit den Ribosomen bei der fraktionierenden Zentrifugation von Zellhomogenaten erwiesen. In ihrem Aufbau besteht offensichtlich eine größere Verwandtschaft zur löslichen als zur hmRNS.

Bei der Säulenchromatographie an MAK wird zusammen mit der DNS eine RNS-Komponente eluiert ("III"), die sich mit Hilfe der Gelfiltration (siehe Seite 21 ff) isolieren läßt. Ihre Basenzusammensetzung unterscheidet sich deutlich von der aller übrigen RNS-Komponenten. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei Chlorella, wo ebenfalls eine RNS-Komponente mit der DNS von der MAK-Säule eluiert wird.

Die 16S- und 23S-RNS ribosomaler Herkunft ("IV" bzw. "V") sind auf Grund ihrer Basenzusammensetzung unterscheidbar. Der höhere AMP-Anteil der schwereren Komponente trägt vermutlich zu der im Vergleich zu Grünalgen und höheren Pflanzen besseren Auftrennung der 16S- und 23S-RNS an MAK bei (LOENING 1968).

Die über eine fraktionierende Zentrifugation des Zellhomogenats angereicherte hmRNS ist in ihrer Zusammensetzung praktisch identisch mit den Nucleinsäuren, die aus dem Gesamtextrakt gewonnen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Erwartung, daß bei Langzeitmarkierung einheitliche Produkte bei unterschiedlichen Isolierungsverfahren anfallen.

Kurzzeit-Einbau: ^{32}P-Orthophosphat wird bei Kurzzeitmarkierung von den Zellen nur unter den optimalen Bedingungen von Temperatur, Medium und Begasung fixiert. Größte Sorgfalt muß daher bei der Zentrifugation und Überführung der Zellen in P-freies Kulturmedium angewendet werden. Wenn die notwendigen Voraussetzungen erfüllt sind, wird bei einer Inkubationszeit von 5 sec eine ausreichende Menge an Radiophosphor stabil eingebaut.

Markierungsexperimente mit ^{32}P-Orthophosphat über kurze Intervalle sind bei Anacystis stets dadurch gekennzeichnet, daß die Hauptmasse der fixierten Radioaktivität in einer Polyphosphatfraktion erscheint (Abb. 23). Diese Polyphosphate stören bei der alkalischen Spaltung der RNS-Komponenten in Mononucleotide, da aus ihnen große Mengen an anorganischem Phosphat freigesetzt werden.

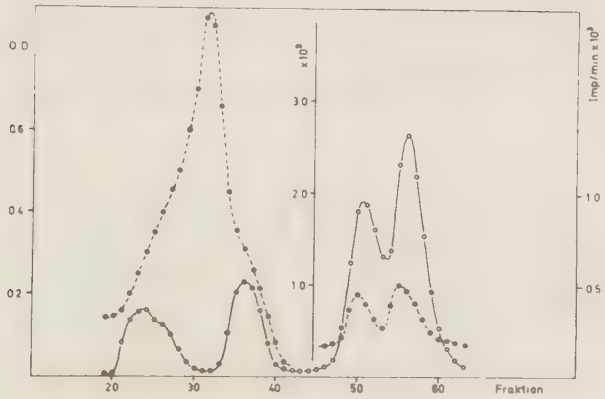
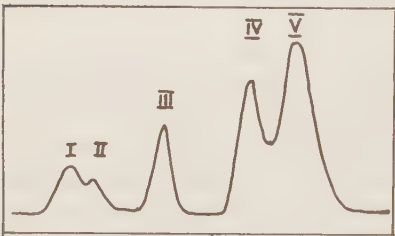


Abb. 23: Fraktionierung der Gesamtnucleinsäuren an MAK nach Kurzzeitmarkierung (5 sec) mit ^{32}P-Orthophosphat (5µC/ml). o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{32}P-Radioaktivität. Eluierung der Polyphosphate in den Fraktionen 20-35.

Schnell markierte Polyphosphate werden auch bei Grünalgen beobachtet; eine vermehrte Synthese erfolgt besonders bei ^{32}P-Inkubation von Phosphor-Mangelzellen (KANAI u. SIMONIS 1968).

Tabelle II: Basenzusammensetzung der Nucleinsäurekomponenten (in %), ermittelt nach Kurzzeitmarkierung der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat.



Nucleinsäure-komponente im Bereich von:	Ausgangs-präparation	CMP	AMP	GMP	UMP
I =lösliche RNS	5 sec ^{32}P isoliert[1]	31.3	19.0	32.7	17.0
II =5S-RNS	5 sec ^{32}P isoliert	28.7	19.2	30.9	21.2
IV =16S-hmRNS	5 sec ^{32}P gesamt[2]	24.7	25.8	30.9	18.6
	5 sec ^{32}P isoliert	25.6	24.8	29.0	20.7
	10 min ^{32}P gesamt	25.4	24.4	31.0	19.2
V =23S-hmRNS	5 sec ^{32}P gesamt	24.2	26.2	30.5	19.1
	5 sec ^{32}P isoliert	25.1	26.0	31.4	17.5
	10 min ^{32}P gesamt	25.4	27.1	29.9	19.6

[1] durch fraktionierende Zentrifugation

[2] nach Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren

Im Bereich der ribosomalen RNS-Komponenten fehlt die Koinzidenz zwischen UV-Maxima und Radioaktivität. Die markierten Komponenten werden etwas früher als die Masse der 16S- und 23S-RNS von der MAK-Säule eluiert. Diese Erscheinung ist typisch für schnell synthetisierte RNS; sie wird u.a. auch bei Chlorella pyrenoidosa gefunden (BEIDERBECK 1968).

Basenzusammensetzung der einzelnen RNS-Komponenten bei Kurzzeitmarkierung: Um die Störung durch Polyphosphate bei der Bestimmung der Basenzusammensetzung von löslicher RNS zu umgehen, wurde der Überstand III (105 000 x g) nach fraktionierender Zentrifugation verwendet (siehe Seite 11). Dabei wird die Hauptmasse der Polyphosphate im Sediment I angereichert. Ein geringer Teil ist Bestandteil von Sediment II und Überstand II und erscheint bei Säulenchromatographie an MAK im DNS-Bereich. Aus diesem Grund konnte die Beschaffenheit DNS-assoziierter RNS bei Kurzzeitmarkierung nicht näher untersucht werden; hinzukommt, daß unter diesen Bedingungen nur relativ wenig ^{32}P in diese Komponente eingebaut wird. Eine Basenanalyse DNS-assoziierter RNS ist bei Anacystis nur nach Langzeitmarkierung mit ^{32}P-Orthophosphat möglich.

Die bei Kurzzeitmarkierung ermittelte Basenzusammensetzung ergibt für die im Bereich der löslichen RNS und der ribosomalen RNS auftretenden markierten RNS-Komponenten keine deutliche Abweichung von den Werten, die bei Langzeitmarkierung für jene ermittelt wurden (Tabelle I). Lediglich die mit der 5S-RNS assoziierte schnell markierte Komponente hebt sich von dieser durch die Gleichheit von Cytosin und Guanin bzw. Adenin und Uracil ab. Damit hat diese RNS eine Gemeinsamkeit mit der klassischen messenger-RNS der Bakterien, als ihre Basenzusammensetzung der homologen DNS sehr ähnlich ist. Die DNS aus Anacystis nidulans besitzt folgende Zusammensetzung (in %): dCMP 27.6, dGMP 27.4, dAMP 22.2, TMP 22.8 (CAPESIUS 1966).

Unabhängig von der Technik der Isolierung (über frakionierende Zentrifugation angereichert oder aus dem Gesamtextrakt isoliert) resultiert eine identische Basenzusammensetzung für die ^{32}P-markierte hmRNS. Sie entspricht der ribosomalen RNS. Bei fraktionierender Zentrifugation werden diese Komponenten größtenteils mit den Ribosomen im Sediment II niedergeschlagen. Offensichtlich sind sie Bestandteile ihrer Struktur.

^{32}P-Markierungsexperimente an Mg-verarmten Zellen

Langzeit-Markierung: Der Einbau von ^{32}P-Orthophosphat über 15 h wurde an Zellen vorgenommen, die 24 h bei reduziertem

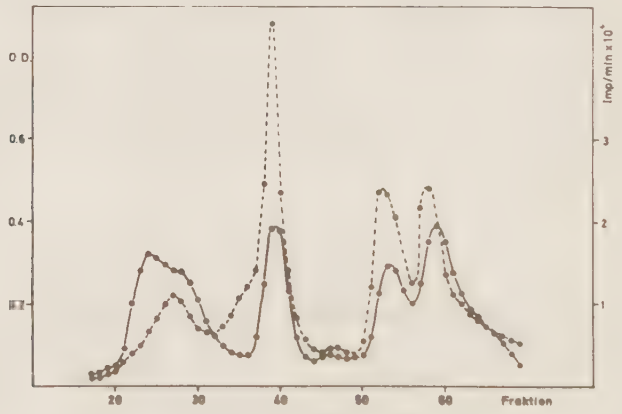


Abb. 24: MAK-Chromatographie der Gesamtnucleinsäuren aus Zellen einer Mg-Mangelkultur (24h mit 10% der normalen Mg-Menge, insgesamt 39h Mg-frei, davon die letzten 15h in Gegenwart von ^{32}P-Orthophosphat (2.5 µC/ml). o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{32}P-Radioaktivität.

Mg-Angebot und 24 h ohne Mg kultiviert worden waren. Die Zellen verblieben damit 24 h + 39 h unter Mangelbedingungen. Das Profil der Radioaktivität im Eluierungsdiagramm nach MAK-Chromatographie besitzt ein hohes Maximum im Bereich der DNS und zwei niedrigere Gipfel in dem der ribosomalen RNS (Abb. 24).

Kurzzeit-Markierung: Im Gegensatz zu den Normalzellen betrug die Pulse-Zeit bei Mg-verarmten Zellen mindestens 45 sec. Als Folge des reduzierten Stoffwechsels fixieren die Organismen bei kurzeren Inkubationszeiten keine ausreichenden Mengen an ^{32}P-Orthophosphat. Wie Abb. 25 zeigt, wird unter Mg-Mangelbedingungen ein großer Teil der ^{32}P-Radioaktivität in Polyphosphate eingebaut; weitere Aktivitätsmaxima gehören zu den ribosomalen Komponenten.

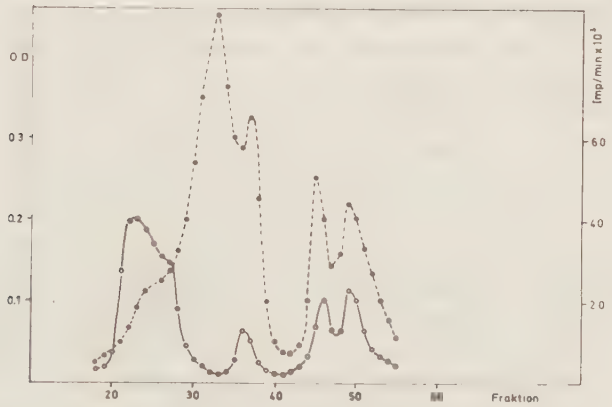


Abb. 25: MAK-Chromatographie der Gesamtnucleinsäuren aus den Zellen einer Mg-Mangelkultur (24h mit 10% der normalen Mg-Menge, 48h ohne Mg). Inkubation mit 5 µC/ml ^{32}P-Orthophosphat für 45 sec. o—o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{32}P-Radioaktivität.

Die Basenzusammensetzung der RNS-Komponenten: Ein Vergleich der Ergebnisse von Kurz- und Langzeitmarkierungs-Experimenten mit ^{3}H-Uridin bzw. mit ^{32}P-Orthophosphat an Mg-verarmten Zellen von Anacystis zeigt, daß diese Vorstufen relativ gut in die hmRNS eingebaut werden. Hieraus kann auf einen lebhaften Umsatz dieser Komponenten geschlossen werden, der selbst bei der eintretenden Abnahme der Gesamtmenge (Reduktion der Maxima im Eluierungsdiagramm!) noch deutlich festzustellen ist.

Tabelle III: Basenzusammensetzung (in %) der beiden hochmolekularen RNS-Komponenten aus Mg-Mangelzellen nach Kurzzeit- und Langzeitmarkierung mit ^{32}P-Orthophosphat. Bezeichnung der Komponenten wie in Tab. I und II.

Nucleinsäurekomponente im Bereich von:	Inkubation Präparation	CMP	AMP	GMP	UMP
IV = 16S-hmRNS	45 sec ^{32}P gesamt)[1]	26.5	24.2	30.5	18.8
	45 sec ^{32}P isoliert)[2]	26.1	24.3	30.7	18.9
	2 min ^{32}P gesamt	27.1	24.4	29.8	18.7
	15 h ^{32}P gesamt	25.1	25.0	30.2	19.7
V = 23S-hmRNS	45 sec ^{32}P gesamt	28.0	25.1	29.0	17.9
	45 sec ^{32}P isoliert	27.4	25.6	29.2	17.9
	2 min ^{32}P gesamt	25.2	25.1	29.2	20.3
	15 h ^{32}P gesamt	23.8	26.8	31.5	17.9

[1] nach Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren

[2] durch fraktionierende Zentrifugation

Um zu prüfen, ob es sich bei diesen schnell markierten RNS-Komponenten um ribosomale RNS - in freier oder gebundener Form - oder etwa um RNS vom "messenger"-Typ handelt, wurde ihre Basenzusammensetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle III wiedergegeben, wobei auch Präparationen nach 2 min Markierung analysiert werden. Zum Vergleich sind die entsprechenden Ergebnisse der Langzeitmarkierung (15 h; siehe Seite 38) aufgeführt.

Wie aus Tabelle III hervorgeht, besteht ein Unterschied zu den Werten, welche für die beiden ribosomalen Grundkomponenten ermittelt werden (vgl. Tabelle I, Seite 33), insofern, als Cytosin bei beiden schnell markierten hmRNS-Komponenten einen etwas höheren Anteil, Adenin einen geringeren Anteil besitzt. Erst bei einer Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat über 15 h wird die typische Zusammensetzung der 16S- und 23S-hmRNS gefunden. Da die Basenanalyse der hmRNS aus den Gesamtnucleinsäuren und aus der Ribosomenfraktion (Sediment II der fraktionierenden Zentrifugation) dieselben Werte ergibt, folgt, daß es sich bei diesen schnell markierten RNS-Komponenten offensichtlich um ribsomale RNS handelt.

Tabelle IV: Basenzusammensetzung der löslichen RNS (I) aus Mg-Mangelzellen (in %).

Inkubationszeit	Ausgangspräparation	CMP	AMP	GMP	UMP
45 sec ^{32}P	gesamt [1]	32.1	18.3	32.3	17.3
45 sec ^{32}P	isoliert [2]	31.8	18.5	32.2	17.5
15 h ^{32}P	gesamt	30.3	19.9	32.3	17.5

[1] nach Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren

[2] durch fraktionierende Zentrifugation

Für die pulse-markierten Komponenten im Bereich der löslichen RNS ergibt sich etwa die gleiche Basenzusammensetzung wie für die entsprechende aus Normalzellen isolierte (siehe Seite 36): die Werte für CMP und GMP sind gleich und liegen bei 32%. AMP und UMP unterscheiden sich geringfügig (Tabelle IV). Ein Vergleich der Nucleotidzusammensetzung löslicher RNS aus Normal- und Mangelzellen ist insofern von Interesse, als er einen Hinweis auf die Natur dieses bei Mg-Verarmung stark vermehrten Anteils liefern könnte. Unter der Annahme, daß bei Mg-Entzug Bruchstücke aus der hmRNS entstehen und bei MAK-Chromatographie in der Region der löslichen RNS eluiert werden, müßte sich die Basenzusammensetzung dieser Fraktion mit steigender Verarmung bzw. bei 15-stündiger Inkubation mit ^{32}P-Orthophosphat in Annäherung an den ribosomalen Typus verändern. Das oben geschilderte Ergebnis zeigt, daß diese Vorstellung offensichtlich nicht zutrifft; bei der relativ stark vermehrten Komponente handelt es sich vorwiegend um lösliche RNS.

Ergänzend sind einige Versuche zu erwähnen, bei denen untersucht wurde, wie lange Mg-verarmte Zellen von Anacystis in fortgeschrittenem Mangelzustand lebensfähig sind. Es handelte sich dabei um Zellen, die 24 h bei reduziertem Mg-Angebot und 96 h in Mg-freiem Medium kultiviert worden waren. Sie wurden für 45 sec mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert und der Einbau in die Nucleinsäuren untersucht. Das Eluierungsdiagramm der säulenchromatographischen Auftrennung an MAK (Abb. 26) zeigt, daß die Versuchszellen selbst in diesem extremen Mangelzustand noch Radiophosphor in Polyphosphate und hmRNS einbauen. Letztere ist in diesem Stadium mengenmäßig so stark reduziert, daß im UV-Diagramm keine Absorptionsmaxima mehr erscheinen.

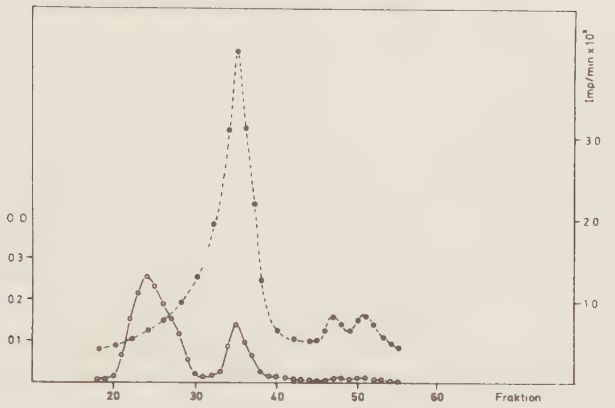


Abb. 26: Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren an MAK. Mg-Mangelkultur (24h 10% der normalen Mg-Menge, 96h ohne Mg), Inkubation mit ^{32}P-Orthophosphat (5µC/ml, 45 sec). o——o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{32}P-Radioaktivität.

3. "Chase"-Experimente

Die "chase"-Technik besteht darin, Zellen nach einer Inkubation mit radioaktiv markierten Vorstufen in das normale ("kalte") Kulturmedium zurückzubringen und in diesem weiterzukultivieren. In verschiedenen zeitlichen Abständen wird die Verteilung der Radioaktivität innerhalb der Zellen überprüft. Die erhaltenen Befunde können Hinweise auf den Bildungsmechanismus einzelner Verbindungen bzw. deren Lebensdauer liefern. Gerade für das Problem der Mg-Verarmung autotropher Zellen bietet sich diese Methode an, vor allem zur Klärung der Frage, ob die Produkte des eintretenden Abbaus der ribosomalen RNS für die beobachtete starke Vermehrung der niedermolekularen RNS verantwortlich sind.

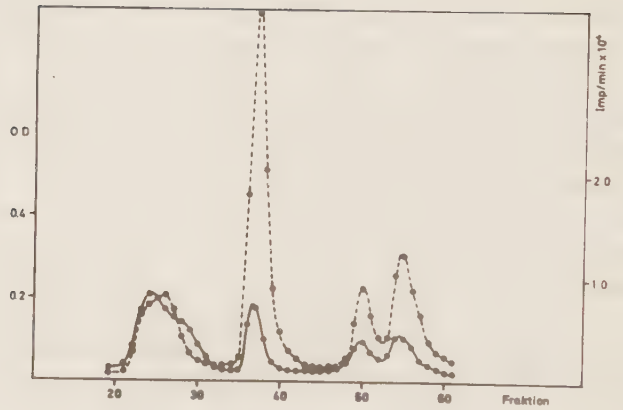


Abb. 27: MAK-Chromatographie der Gesamtnucleinsäuren aus Anacystis. "Chase"-Experiment: Inkubation der Normalzellen mit ^{3}H-Uridin für 2h, Überführung in Mg-freies Nährmedium (ohne ^{3}H-Uridin), Kulturdauer 96h. o—o Absorption bei 254 nm, ●---● ^{3}H-Radioaktivität.

Normalzellen von Anacystis erhielten im Vollmedium für 2 h ^{3}H-Uridin (5µC/ml); anschließend wurden sie schonend und steril abzentrifugiert und in Mg-freiem Nährmedium (ohne ^{3}H-Uridin) über 96 h weiterkultiviert. Danach erfolgte die Extraktion und chromatographische Auftrennung der Nucleinsäuren in der üblichen Weise. Erwartungsgemäß wird von der Abnahme der Gesamtmenge an ribosomaler RNS auch die fixierte ^{3}H-Radioaktivität dieser Komponenten gleichsinnig betroffen. Ein hohes Maximum der Radioaktivität erscheint im Bereich der DNS, während in dem der löslichen RNS eine entsprechende Zunahme fehlt (Abb. 27). Die letztgenannte Beobachtung in Verbindung mit der ermittelten Basenzusammensetzung der niedermolekularen RNS nach Langzeitmarkierung der Mg-Mangelzellen mit ^{32}P-Orthophosphat (siehe Seite 41f) sprechen dafür, daß an der starken Zunahme der niedermolekularen RNS im Bereich der löslichen RNS bei Mg-Verarmung keine Abbauprodukte der ribosomalen RNS beteiligt sind.

DISKUSSION

Die bei Entzug eines Makro- oder Mikroelements aus dem Nährmedium bei einem autotrophen Organismus auftretenden Effekte sind komplexer Natur. Sie setzen sich aus direkten und indirekten Ausfallerscheinungen zusammen. Die ersteren treten deutlich hervor, wenn ein Element für einen bekannten und überschaubaren Prozess oder Reaktionsschritt essentiell ist. Beispiele für direkte Mangeleffekte bei Mg-Entzug sind: 1.die Chlorophyll-Biosynthese - der Einbau des spezifischen Zentralatoms in die Porphyrinverbindung unterbleibt; 2. die von RNS-Polymerase und Polynucleotid-Phosphorylase katalysierten Reaktionen bedürfen der Mitwirkung von Mg^{2+} (für die pflanzlichen Enzyme vgl. CAPESIUS u. RICHTER 1967) und werden bei Mg-Verarmung beeinträchtigt; 3. die Ribosomenstruktur in vivo und in vitro bleibt nur in Gegenwart von Mg^{2+} erhalten.

Für die vorstehend beschriebenen Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel bei Mg-Verarmung wurde ein relativ leichter Mangelzustand gewählt. Hierdurch sollte das Auftreten von irreparablen Veränderungen vermieden werden. Daß diese bei Mg-Verarmung allgemein nur in geringem Umfang vorliegen, bewiesen Kontrollexperimente mit extrem Mg-verarmten Zellen: sie zeigten einen aktiven Nucleinsäurestoffwechsel, d.h. einen Einbau und Umbau radioaktiver Vorstufen, und besaßen die Fähigkeit, bei Überführung in Normalmedium verhältnismäßig schnell in den Normalzustand zurückzukehren. Die Versuchszellen aus allen untersuchten Stadien der Mg-Verarmung kamen nach Zugabe der benötigten Mg-Salze zur völligen Erholung und zu normalem Stoffwechsel.

Hierbei muß jedoch bedacht werden, daß bei diesen Experimenten nur Aussagen über das Verhalten des Kollektivs möglich sind; sie gelten dementsprechend jeweils für das Verhalten der überwiegenden Anzahl der Versuchszellen. Die relativ kurze Zeit, die zur Erholung der Mangelkulturen notwendig ist, das Fehlen abgestorbener Zellen im mikroskopi-

schen Bild und andere Befunde bestätigen die Richtigkeit dieser Vorstellung.

Bei den gewählten Versuchsbedingungen zieht eine Mg-Verarmung bei Anacystis vor allem die Ribosomenstruktur in Mitleidenschaft, indem die RNS-Anteile dieser Organelle verändert werden. Die Säulenchromatographie der isolierten Nucleinsäuren an MAK zeigt an, daß offensichtlich die Menge an hmRNS infolge Mg-Verarmung stark abnimmt. So fehlt im Eluierungsdiagramm der Nucleinsäuren aus 5 Tage alten Mangelzellen die hmRNS völlig. Gleichartige Effekte wurden bei anderen Versuchsobjekten, Mg-Mangelzellen von Chlorella pyrenoidosa und Petroselinum sativum, beobachtet. Demnach werden Organismen verschiedenster Organisationsstufen von einer Mg-Verarmung gleichartig betroffen. Hierbei ergeben sich lediglich Unterschiede hinsichtlich der Zeit, die zur Auslösung der typischen Mangelsymptome erforderlich ist. Für Zellen von Anacystis wird bereits nach 4 Tagen ein extremer Mangelzustand erreicht. Chlorella und mehr noch Petroselinum reagieren auf Mg-Entzug weniger empfindlich. Inwieweit dieser Unterschied auf der normalerweise sehr hohen Teilungsrate von Anacystis beruht, muß offen bleiben. Möglicherweise besitzen Chlorella und Petroselinum größere zelluläre Mg-Reserven.

Die Gleichartigkeit der Effekte bei den chlorophyllfreien Zellen der Suspensionskulturen von Petroselinum und bei den Photosyntheseorganismen Anacystis und Chlorella machen weiterhin deutlich, daß die Auswirkung von Mg-Verarmung auf Ribosomen und Nucleinsäuren direkt und nicht etwa über eine Schädigung des Photosyntheseapparates erfolgen. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß es bei Anacystis unter mäßigem Mg-Mangel zu keiner nachhaltigen Veränderung in der Pigmentgarnitur kommt.

Eine gute Übereinstimmung in der beobachteten Abnahme ribo-

somaler RNS infolge Mg-Verarmung bei Anacystis, Chlorella und Petroselinum besteht auch mit den Ergebnissen gleichartiger Untersuchungen an Escherichia coli. NATORI und Mitarb. (1965) beobachteten bei diesem Organismus in Abhängigkeit vom Mg-Entzug eine mengenmäßige Abnahme der hmRNS und eine deutliche Vermehrung der löslichen RNS. Da bei Zellen von E.coli unter Mg-Mangelbedingungen keine Fixierung radioaktiv markierter Vorstufen in die lösliche RNS stattfindet, sollen nach NATORI u. Mitarb. für den Zuwachs dieser Fraktion die beim Zerfall der ribosomalen RNS auftretenden Bruchstücke verantwortlich sein. Im Falle von Anacystis ist diese Annahme sicherlich nicht zutreffend: die Basenzusammensetzung der löslichen RNS nach langfristiger Inkubation der Mangelzellen mit ^{32}P-Orthophosphat entspricht völlig der von löslicher RNS aus Normalzellen. "Chase"-Experimente, bei denen Zellen nach Langzeitmarkierung mit radioaktiven Vorstufen in Mg-freies Medium ohne Radioaktivität überführt wurden, ergaben, daß kein verstärkter Einbau von Radioaktivität in die lösliche RNS unter diesen Bedingungen erfolgte. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für die oben ausgesprochene Vermutung, wonach die festgestellte Vermehrung niedermolekularer RNS ausschließlich auf einer gesteigerten Synthese von löslicher RNS beruht. Es erscheint überdies unwahrscheinlich, daß die Abbauprodukte der hmRNS infolge Mg-Verarmung der Zellen in ihren Eigenschaften so exakt mit der löslichen RNS übereinstimmen, daß sie von der MAK-Säule mit der letzteren als einheitliche Fraktion eluiert werden. Entsprechende Bruchstücke sind eher im Säulenvorlauf beim Start der Elution zu erwarten; der Vorlauf ist tatsächlich vermehrt, wenn die Gesamtnucleinsäuren aus Mg-verarmten Zellen von Anacystis aufgetrennt werden. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß mit der löslichen RNS auch eine schnell markierte RNS-Komponente eluiert wird, die sehr ähnliche Eigenschaften wie die erstere besitzt (Basenzusammensetzung!) und deren Existenz bei Kurzzeit-Markierungsexperimenten an Normalzellen von Anacystis

nachgewiesen wurde (siehe Seite 37). Die bei kurzfristigem Einbau von ^{32}P-Orthophosphat in die lösliche RNS von Mg-Mangelzellen gefundene, geringfügige Abweichung in der Basenzusammensetzung fände damit eine Erklärung (siehe Tabelle IV).

Wie die durchgeführten Markierungsexperimente zeigen, besitzt die hmRNS trotz deutlicher Abnahme in der Gesamtmenge einen hohen Umsatz. Da die normalen ribosomalen Strukturen weitgehend aufgelöst sind, erhebt sich die Frage, in welcher Form diese schnell markierten, hochmolekularen Komponenten in den Mangelzellen vorliegen. Durch fraktionierende Zentrifugation gelang es, die im Kurzzeit-Markierungsexperiment eingebaute Radioaktivität nahezu quantitativ mit der Ribosomenfraktion niederzuschlagen. Ungeklärt ist, ob es sich bei dieser um intakte Ribosomen, um definierte Ribosomenuntereinheiten oder nur um Bruchstücke handelt, die sich bei der gewählten Methode in einer Fraktion anreichern. Entsprechende Versuche mit ^{32}P-Orthophosphat als Vorstufe mit anschließender Basenanalyse dieser schnell markierten, hochmolekularen Komponenten haben gezeigt, daß sie in dieser Hinsicht den ribosomalen 16S- und 23S-Komponenten aus Normalzellen ziemlich ähnlich sind.

Im Zusammenhang mit dem Auftreten schnell markierter RNS-Komponenten erhebt sich zwangslaufig die Frage, ob diese mit der "messenger"- ("Botschafter"-) RNS identisch sind oder in Beziehung stehen. Bei den Normalzellen gilt das Interesse zunächst der RNS-Komponente, die zusammen mit der DNS von der MAk-Säule eluiert wird und zumindest bei Chlorella pyrenoidosa eine spezifische Basenzusammensetzung besitzt. Bei Anacystis gelang der Nachweis dieser "DNS-assoziierten" RNS bei Normal- und Mangelzellen nur nach Langzeitmarkierung mit ^{32}P-Orthophosphat, nicht hingegen nach kurzfristiger Inkubation, bei der die Polyphosphate wegen ihrer starken ^{32}P-Markierung eine Isolierung der Nucleinsäuren im DNS-Bereich

verhindern. Immerhin wird aus dem Profil der Radioaktivität im Eluierungsdiagramm deutlich, daß im DNS-Bereich markierte Nucleinsäuren vorliegen: das Maximum der Polyphosphate besitzt über diesem eine Schulter. Bei kurzfristigen Gaben von ^{3}H-Uridin als markierte Vorstufe war hingegen die "DNS-assoziierte" RNS nicht nachweisbar. Dieser Befund beweist nicht unbedingt das völlige Fehlen dieser Komponente; möglicherweise ist das angebotene Uridin ungeeignet, um als Vorstufe bei der Bildung dieser RNS-Komponente verwendet zu werden. Eine weitere schnell markierte Komponente, die in diesem Zusammenhang interessiert, wurde bei Normalzellen nach kurzfristigem Einbau von ^{3}H-Uridin bei Säulenchromatographie an MAK als zusätzliche Schulter der ^{3}H-Radioaktivität über der absteigenden Flanke des UV-Gipfels der 23S-Komponente gefunden (siehe Abb. 9). Diese Komponente mit hoher spezifischer Aktivität soll nach Auffassung einiger Autoren mit "messenger"-RNS identisch sein (CHERRY u. van HUYSTEE 1965; WOLLGIEHN 1968). Sie soll bei höheren Pflanzen einen relativ hohen Gehalt an Adenin besitzen (WOLLGIEHN u. RUESS 1968). Im Gegensatz dazu besitzen die schnell markierten Komponenten der hmRNS aus Anacystis bei Lang- und Kurzzeitmarkierung mit ^{32}P-Orthophosphat eine identische Basenzusammensetzung. Eine weitere schnell markierte und AMP-reiche Komponente aus höheren Pflanzen wird so fest an MAK adsorbiert, daß der gängige NaCl-Gradient nicht zur Eluierung ausreicht. Sie gelingt nur mittels Na-Dodecylsulfat bzw. 1 n NaOH (EWING u. CHERRY 1968). Eine notwendige Voraussetzung für die Isolierung dieser Fraktion scheint jedoch ein modifiziertes Extraktionsverfahren für die Nucleinsäuren aus dem Zellhomogenat zu sein (KIRBY 1965). Über seine Brauchbarkeit für Anacystis liegen noch keine Erfahrungen vor.

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, werden bei normalen und Mg-verarmten Zellen die markierten Vorstufen bevorzugt in die hmRNS eingebaut. Ihre Komponenten stellen auch mengen-

mäßig den Hauptanteil der zellulären RNS. Da neuerdings eine Komplexbildung zwischen "messenger"- und ribosomaler RNS bei säulenchromatographischer Auftrennung an MAK diskutiert wird, die vor allem durch die relativ hohe NaCl-Konzentration bei der Elutierung bewirkt werden soll (ASANO 1965), muß im Fall von Anacystis in Betracht gezogen werden, daß schnell markierte RNS vom "messenger"-Typ durch die unverhältnismäßig stark markierte ribosomale RNS überdeckt wird - mehr noch: durch eine Bestimmung der Basenzusammensetzung nicht erfaßt werden kann.

Damit ergibt sich die Notwendigkeit, eine Trennung partikulär gebundener, markierter, ribosomaler RNS von den "freien", schnell markierten Komponenten durchzuführen. Wie die Versuchsergebnisse zeigen, führte dieser Weg mittels fraktionierender Zentrifugation nicht zum erhofften Erfolg. Selbst nach Auflösung der Ribosomenstruktur als Folge des Mg-Mangels ist eine Abtrennung schnell markierter, hochmolekularer RNS im Überstand nach Ultrazentrifugation des Zellhomogenats nicht zu erreichen. Dieses Ergebnis kann folgendermaßen interpretiert werden: 1. Die Synthese der "messenger"-RNS wird in dem Maße vermindert, wie die Zahl der intakten Ribosomen absinkt. 2. Auch die bei Mg-Verarmung anfallenden Ribosomenfragmente sind in der Lage, schnell markierte RNS vom "messenger"-Typ zu binden. Für die erstgenannte Möglichkeit hat STENT (1964) auf Grund von Untersuchungen an Bakterien eine Vorstellung entwickelt, wonach die Synthese von "messenger"-RNS durch die Zahl der unbeladenen Ribosomen kontrolliert wird. Die Gültigkeit dieser Theorie ist in jüngerer Zeit durch FORCHHAMMER u. Mitarb. (1968) bestätigt worden: sie konnten nachweisen, daß die "messenger"-RNS in Verbindung mit 30S-Partikeln von der DNS abgelöst wird. Tatsächlich hatten NAONO u. Mitarb. (1966) an Bakterien gefunden, daß bei einem Absinken der Ribosomen in den Zellen unter einen Schwellenwert von 20% der normalen Zahl nur noch eine äußerst geringe Synthese von "messenger"-RNS stattfindet.

Es wird nur soviel "messenger"-RNS gebildet, wie für die stark reduzierte Proteinsynthese benötigt wird. Dieser Kontrollmechanismus gilt nicht in gleicher Weise für die Bildung von ribosomaler RNS, denn wie die Versuchsergebnisse an Anacystis zeigen, erfolgt in ihre Komponenten auch unter Mangelbedingungen ein starker Einbau markierter Vorstufen.

Eine interessante Phase zum Studium schnell markierter RNS stellt der einsetzende Erholungsprozess dar, welcher mit der Überführung Mg-verarmter Zellen in Vollmedium eingeleitet wird und der in relativ kurzer Zeit zur Normalisierung des Stoffwechsels führt. Er sollte durch eine verstärkte Bildung von "messenger"-RNS ausgezeichnet sein. So ist für Chlorella bekannt, daß bei Erholung vom N-Mangel schnell markierte, hochmolekulare RNS-Komponenten in freier, d.h. nicht partikelgebundener Form, nachweisbar sind, wenn den Zellen kurzfristig ^{32}P-Orthophosphat im Licht angeboten wird (GALLING u. RICHTER 1966). Bei E. coli haben PIGOTT u. Mitarbeiter (1968) gefunden, daß bei Erholung vom Mg-Mangel eine starke Bildung von "messenger"-RNS erfolgt. Im Gegensatz hierzu stehen die eigenen Befunde an Anacystis, die allerdings nur orientierenden Charakter tragen, und die Ergebnisse von COHEN u. ENNIS (1967), die bei E. coli im entsprechenden Erholungsstadium ein Absinken der RNS-Synthese feststellten. Hier müssen weitere Untersuchungen zur Abklärung dieses Problems einsetzen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Wachstum der Zellen von Anacystis nidulans, Chlorella pyrenoidosa und Petroselinum sativum wurde in normalen und in Mg-freien Kulturmedien untersucht.

2. Die mengenmäßige Verteilung der Nucleinsäuren in den drei Organismen wurde in Abhängigkeit von der Mg-Verarmung bestimmt und mit der von Normalzellen verglichen. Mg-Entzug hatte in allen Fällen eine Verringerung der ribosomalen RNS einschließlich der zugehörigen 5S-Komponente und - relativ zu den übrigen Komponenten - eine Zunahme an löslicher RNS zur Folge. Die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Mg-Entzug ist bei den drei untersuchten Organismen unterschiedlich; am nachhaltigsten werden die Zellen von Anacystis betroffen. Letztere sind in diesem Zustand noch lebensfähig: Bei Überführung in komplettes Nährmedium erholen sie sich relativ schnell; ihre Nucleinsäuren zeigen einen lebhaften Umsatz.

3. Die Untersuchung des Nucleinsäurestoffwechsels normaler und Mg-verarmter Zellen von Anacystis erfolgte unter Verwendung der radioaktiv markierten Vorstufen ^{3}H-Uridin und ^{32}P-Orthophosphat. Es zeigte sich, daß die Mg-verarmten Zellen einen im Vergleich zu den Normalzellen sehr regen Stoffumsatz besitzen. Dabei treten schnell synthetisierte RNS-Komponenten auf, die größtenteils mit den noch vorhandenen Ribosomen bzw. ihren Abbauprodukten isolierbar sind.

4. Typisch für eine kurzfristige Markierung der Zellen von Anacystis mit ^{32}P-Orthophosphat ist das Auftreten schnell markierter Polyphosphate, welche die Isolierung der niedermolekularen RNS und der DNS mittels Säulenchromatographie an methyliertem Albumin + Kieselgur stark erschweren. Von der ersteren enthält die lösliche

RNS der normalen und Mg-verarmten Zellen stets nur geringe Mengen an radioaktiv markierten Vorstufen. Dagegen werden diese im kurzzeit-Markierungsexperiment bevorzugt in eine Komponente eingebaut, der aufgrund ihrer Basenzusammensetzung der Charakter von "messenger"-RNS zugesprochen werden muß.

5. Eine mit der DNS unter den verwendeten Trennungsmethoden assoziierte und ebenfalls relativ leicht markierbare RNS unterscheidet sich in ihren Eigenschaften deutlich von allen anderen RNS-Komponenten von Anacystis.

6. Quantitative Untersuchungen und "chase"-Experimente sprechen dafür, daß die relative mengenmäßige Vermehrung der löslichen RNS in Mg-verarmten Zellen nicht durch die anfallenden Abbauprodukte der ribosomalen RNS verursacht wird. Letztere wird - wie oben ausgeführt - bei Mg-Verarmung stark vermindert.

7. Die Bedeutung der verschiedenen nachgewiesenen, schnell synthetisierten RNS-Komponenten in normalen und Mg-verarmten Zellen von Anacystis wird im Hinblick auf ihre mögliche Funktion als "messenger"-RNS diskutiert.

Ich danke Herrn Prof.Dr.G.Richter für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk sei für apparative Unterstützung gedankt.

LITERATURVERZEICHNIS

Aronson,A.I. and B.J.McCarthy: Biophys.J. 1, 215 (1961)
Asano,K.: J.Mol.Biol. 14, 71 (1965)
Badour,S.S.A.: Flora 151, 99 (1961)
Banerjee,K.C. and D.J.Perkins: Biochim.Biophys.Acta 61, 1 (1962)
Barber,R.: Biochim.Biophys.Acta 134, 207 (1967)
Beiderbeck,R: Dissertation, Tübingen 1968
Capesius,I.: Dissertation, Tübingen 1966
Capesius,I. und G.Richter: Z.f.Naturforschg. 22b. 876 (1967)
Cheo,P.C., B.S.Friesen and R.L.Sinsheimer: Proc.Nat.Acad.Sci.Wash. 45, 305 (1959)
Cherry,J.H. and R.B.van Huystee: Science 150, 1450 (1965)
Choi,Y.S. and C.W.Carr: J.Mol.Biol. 25, 331 (1967)
Cohen,P.S. and H.L.Ennis: Biochim.Biophys.Acta 145, 300 (1967)
Drach,J.C. and J.B.Lingrel: Biochim.Biophys.Acta 123, 345 (1966)
Edelman,I.S., P.O.P.Ts'o and J.Vinograd: Biochim.Biophys.Acta 43, 393 (1960)
Erlenmeyer,H., R.Griesser, B.Prijs and H.Sigel: Biochim.Biophys.Acta 157, 637 (1968)
Ewing,E.E. and J.H.Cherry: Biochim.Biophys.Acta 161, 331 (1968)
Forchhammer,J. and N.O.Kjeldgraard: J.Mol.Biol. 37, 245 (1968)
Galling,G.: Arch.f.Mikrobiol. 46, 150 (1963)
Galling,G.: Naturwissenschaften 54, 20 (1967)
Galling,G. and G.Richter: Biochim.Biophys.Acta 123, 613 (1966)
Gierer,A.: J.Mol.Biol. 6, 148 (1963)
Goldberg,A.: J.Mol.Biol. 15, 663 (1966)
Hamilton,M.G. and M.L.Petermann: J.Biol.Chem. 234, 1441 (1959)
Hemleben-Vielhaben,V.: Z.f.Naturforschg. 21b, 983 (1966)

Hsiao,T.C.: Biochim.Biophys.Acta 91, 598 (1964)
Kanai,R. und W.Simonis: Arch.f.Mikrobiol. 62, 56 (1968)
Kennell,D. and B.Magasanik:
Biochim.Biophys.Acta 55, 139 (1962)
Kirby,K.S.: Biochem.J. 96, 266 (1965)
Kratz,W.A. and J.Myers: Am.J.Bot. 42, 282 (1955)
Kuhl,A.: Ber.d.dt.Bot.Gesellschaft 1, 157 (1962)
Loening,U.E.: Ann.Rev.Plant Physiol. 19, 37 (1968)
Mandell,J.D. and A.D.Hershey: Analyt.Biochem. 1, 66 (1960)
McCarthy,B.J.: Biochim.Biophys.Acta 55, 880 (1962)
Moore,P.B. and K.Asano: J.Mol.Biol. 18, 21 (1966)
Nakada,D. and M.J.Marquisee: J.Mol.Biol. 13, 351 (1965)
Nakamura,K. and T.Tamaoki:
Biochim.Biophys.Acta 161, 368 (1968)
Naono,S., J.Rouvière and F.Gros:
Biochim.Biophys.Acta 129, 271 (1966)
Natori,S. and D.Mizuno:
Biochim.Biophys.Acta 145, 328 (1967)
Natori,S., R.Nozawa and D.Mizuno:
Biochim.Biophys.Acta 114, 245 (1965)
Nolan,R.D. and H.R.V.Arnstein: Biochem.J. 108, 20P (1968)
Pigott,G.H. and J.E.M.Midgley: Biochem.J. 108, 34P (1968)
Pringsheim,E.G.: Arch.f.Mikrobiol. 63,1 (1968)
Richter,G.: Planta 57, 202 (1961)
Richter,G. and H.Senger:
Biochim.Biophys.Acta 87, 502 (1964)
Seitz,U. und G.Richter: in Vorbereitung
Shack,J. and B.S.Bynum: Nature 184, 635 (1959)
Sheard,B., S.H.Miall and A.R.Peacooke; I.O.Walker and
R.E.Richards: J.Mol.Biol. 28, 389 (1967)
Siddiqui,M.A.G. and K.Hosokawa:
Biochem.Biophys.Res.Com. 32, 1 (1968)
Staehelin,M.: Experientia (Basel) 15, 413 (1959)
Stent,G.S.: Science 144, 816 (1964)
Storck,R.: Biophys.J. 3, 1 (1963)

Suzuki,H. and Y.Hayashi:
Biochim.Biophys.Acta 87, 610 (1964)
Tissières,A., J.D.Watson, D.Schlessinger and
B.R.Hollingworth: J.Mol.Biol. 1, 221 (1959)
Ts'o,P.O.P., J.Bonner and J.Vinograd:
Biochim.Biophys.Acta 30, 570 (1958)
Wollgiehn,R.: Flora 159, 58 (1968)
Wollgiehn,R. und M.Ruess:
Z.f.Naturforschg. 23b,1198 (1968)
Zubay,G.: Biochim.Biophys.Acta 32, 233 (1959)

Lebenslauf

6.2.1940 als Tochter des praktischen Arztes Dr. Rudolf Köstlin und seiner Ehefrau Hildegard Köstlin geb. Hauff in Stuttgart geboren.

1946 - 1950 Grundschule in Holzmaden/Teck und Kornwestheim.

1950 - 1959 Goethe-Gymnasium in Ludwigsburg; Abitur 1959

SS 1959 - WS 1959/60 Studium der Germanistik an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen; Großes Latinum 1960

1960 - 1966 Studium der Biologie an den Universitäten Tübingen und Innsbruck (2Semester).

Seit WS 1964/65 Arbeit an der Dissertation: "Einfluß der Mg-Verarmung auf den Nucleinsäurestoffwechsel von Anacystis nidulans" unter Anleitung von Prof. Dr. G. Richter am Botanischen Institut der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren:
Bayer, Bünning, Gams, Giseler, Grell, Hölder, Huber, Mägdefrau, Metzner, Möhres, Eugen Müller, Nultsch, Richter, Risler, Rödorff, Schwarz, Schwemmle, Wagner, Weitzel, Wittmann.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen